

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA

PEDIATRIA

# Microbiota intestinal e disbiose em idade pediátrica: o que esperar no plano fisiológico?

Diana Patrícia Pereira da Costa

**M**

2019



# **Microbiota intestinal e disbiose em idade pediátrica: o que esperar no plano fisiológico?**

Diana Patrícia Pereira da Costa

diana\_costa\_88@hotmail.com

Mestrado Integrado em Medicina

Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, Universidade do Porto

**A orientadora:**

Dr.<sup>a</sup> Helena Maria Castro Moura Ferreira Mansilha

Assistente Graduada do Serviço de Pediatria do

Centro Materno Infantil do Norte Dr. Albino Aroso, Centro Hospitalar Universitário do Porto

Docente da Unidade Curricular de Medicina da Criança e do Adolescente I do ICBAS-UP

**A coorientadora:**

Prof.<sup>a</sup> Doutora Esmeralda Emília Gomes Martins

Assistente Graduada do Serviço de Pediatria do

Centro Materno Infantil do Norte Dr. Albino Aroso, Centro Hospitalar Universitário do Porto

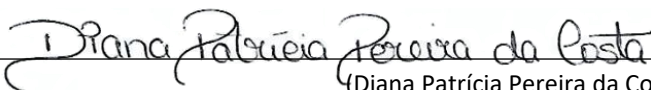
Professora Auxiliar Convidada das Unidades Curriculares de Medicina da Criança e do Adolescente

I e II do ICBAS-UP

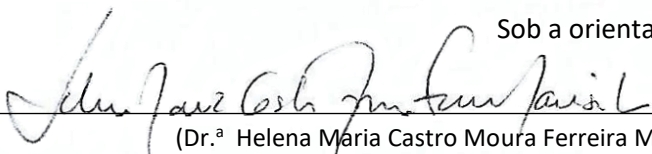
julho de 2019

Porto, 5 de julho de 2019


A estudante,

  
(Diana Patrícia Pereira da Costa)

Sob a orientação de,

  
(Dr.<sup>a</sup> Helena Maria Castro Moura Ferreira Mansilha)

Sob a coorientação de,

  
(Prof.<sup>a</sup> Doutora Esmeralda Emília Gomes Martins)

## AGRADECIMENTOS

Ao Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto e ao Centro Hospitalar Universitário do Porto, bem como a toda a equipa de docentes e profissionais de saúde que integram o seu quadro técnico, por me proporcionaram uma formação rigorosa e completa nas várias valências da Medicina. Um muito obrigada pelas múltiplas experiências enriquecedoras que me foi permitido vivenciar, quer a nível profissional como pessoal, vivências essas que me guiaram e me marcaram enquanto futura Médica. Apesar das inúmeras dificuldades técnicas e humanas na condução do exercício médico que foram observadas e experienciadas, o contacto humanizante com a pessoa doente foi, de uma forma profunda, muito gratificante, permitindo-me encarar com maior determinação este futuro profissional que, orgulhosamente, sonhei abraçar.

À Dr.<sup>a</sup> Helena Mansilha, a minha orientadora, por ter aceite orientar este trabalho, pela disponibilidade, pelo saber e rigor com que me presenteou, bem como pela pertinência das reflexões e partilha do conhecimento. Um muito obrigada por toda a paciência e por todo o apoio demonstrados.

À Prof.<sup>a</sup> Doutora Esmeralda Martins pela disponibilidade com que se prontificou a ser minha coorientadora neste projeto.

Aos meus familiares, pelo apoio constante e incansável, pela infinita paciência e compreensão que souberam revelar face ao tempo que lhes retirei ao meu convívio durante todo o meu percurso académico. Em especial, à minha avó Ana, que deste mundo já partiu faz alguns largos anos, pela educação exemplar e pelo entusiasmo com que sempre recebeu o meu sucesso escolar, pois tenho a convicção de que onde quer que ela esteja, certamente estará orgulhosa por tudo o que alcancei enquanto estudante e futura profissional.

Ao meu namorado, Nuno Silva, por me acompanhar em todas as horas, em todos os bons e menos bons momentos, não me deixando desistir nunca e sempre me incentivando para dar o meu melhor, acreditando em mim e nas minhas capacidades intelectuais mais do que eu própria. Um muitíssimo obrigada por me ter possibilitado a realização deste sonho e pelo amor incondicional com que sempre me presenteou.

Aos meus amigos que me acompanharam e ajudaram a tornar mais fáceis os momentos difíceis, pelos preciosos contributos, incentivo e ânimo, bem como pela amizade incondicional.

A todos aqueles que, direta e indiretamente, tornaram possível atingir esta meta, UM MUITO OBRIGADO!

*“Acreditar na medicina seria a suprema loucura se não acreditar nela não fosse uma maior ainda,  
pois desse acumular de erros, com o tempo, resultaram algumas verdades.”*

Marcel Proust

*“O sucesso nasce do querer, da determinação e da persistência em se chegar a um objetivo.  
Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”*

José de Alencar

## RESUMO

**Introdução:** O corpo humano é habitado por um número de simbioses microbianos dez vezes superior à totalidade de células humanas, estando esses distribuídos por vários órgãos e tecidos. A microbiota intestinal do Homem é constituída por dezenas de bilhões de microrganismos e a colonização do trato gastrointestinal em idade pediátrica é um processo essencial no ciclo de vida humano, uma vez que as interações de mutualismo estabelecidas entre a microbiota e o hospedeiro apresentam consequências importantes para a saúde e para a doença humana. A aquisição e a diversidade da microbiota intestinal em idade pediátrica têm sido alvo de vários estudos, particularmente com o advento do sequenciamento de próxima geração e com desenvolvimento da metagenómica, metatranscriptómica, metaproteómica e metametabolómica.

**Objetivos:** Analisar os principais fatores que contribuem para o desenvolvimento da microbiota intestinal em idade pediátrica, com foco particular no microbioma bacteriano, e explicar os benefícios fisiológicos, a curto e a longo prazo, da relação simbiótica com o hospedeiro. Avaliar as implicações da disbiose no desenvolvimento da doença pediátrica e, futuramente, da doença no adulto.

**Metodologia:** Consulta da base de dados eletrónica MEDLINE® (PubMed®), com a seleção de artigos científicos publicados entre 1992 e 2019, os quais triados inicialmente pela leitura do *abstract* e pela relevância dos objetivos estabelecidos. Deu-se preferência a estudos pré-clínicos, ensaios clínicos, estudos clínicos comparativos e estudos clínicos multicêntricos, com recurso ocasional a meta-análises e a revisões sistemáticas.

**Desenvolvimento:** A colonização intestinal é um processo complexo e dinâmico, desenvolvendo-se por fenómenos de sucessão microbiana desde o nascimento até aos 2-3 anos de idade, altura em que estabiliza e torna-se semelhante a uma microbiota adulta. Estão descritos inúmeros fatores que podem causar flutuação no microbioma intestinal, particularmente no primeiro ano de vida, incluindo a via de nascimento, a idade gestacional e o peso ao nascer, o tipo de alimentação, a exposição a antibióticos e fatores do meio envolvente. Dados recentes sugerem ainda a ocorrência de colonização *in útero*. A microbiota intestinal desempenha um papel central na saúde, intervindo no desenvolvimento das principais funções metabólicas e imunológicas do hospedeiro em idade pediátrica. Alterações/desequilíbrios nas funções ou no padrão da microbiota intestinal precoce (disbiose) estão associados a vários processos de doença na criança (ex.: enterocolite necrosante, obesidade infantil, atopia e asma, perturbação do espectro do autismo, etc.), com impacto no risco de suscetibilidade à doença na idade adulta.

**Conclusão:** Os primeiros 1000 dias após a conceção são considerados uma “janela de oportunidade” para o desenvolvimento saudável da criança e, logo, do futuro adulto. O estudo da microbiota intestinal humana está em franco desenvolvimento, havendo evidências recentes do

seu papel na fisiologia humana e da sua associação com diferentes patologias, as quais poderão ser prevenidas e/ou tratadas por modulação microbiana.

**Palavras-chave:** *“microbiota intestinal”, “colonização do intestino em idade pediátrica”, “imunidade intestinal”, “eixo microbiota-intestino-cérebro”, “disbiose intestinal”*

## ABSTRACT

**Introduction:** The human body is inhabited by a number of microbial symbionts ten times greater than all human cells, and these are distributed through various organs and tissues. The human gut microbiota comprises tens of billions of microorganisms. The microbial colonization of the infant gastrointestinal tract is an essential process in the human lifecycle since mutualistic interactions established between the microbiota and the host have important consequences for human health and disease. Acquisition and diversity of the infant gut microbiota have been the subject of several studies, particularly with the advent of next generation sequencing and development of metagenomics, metatranscriptomics, metaproteomics and metametabolomics.

**Objectives:** To analyze the major factors that contribute to the development of gut microbiota in childhood, with particular focus on the bacterial microbiome. To explain the short- and long-term physiological benefits of the interactions between symbiotic microbes and the host. To assess implications of dysbiosis in the development of pediatric and future adult disease.

**Methodology:** the electronic database MEDLINE® (PubMed®) was searched and scientific articles published between 1992 and 2019 were selected. All articles were initially sorted by reading their abstract and by the relevance of the established objectives. Preclinical studies, clinical trials, comparative clinical studies, and multicenter clinical trials were preferred, but meta-analyses and systematic reviews were occasionally selected.

**Development:** gut colonization is a complex, dynamic, and step-wise process that is in constant development during the first 2 to 3 years of life by microbial succession phenomena. At that time, the infant gut microbiota stabilizes and becomes similar to an adult gut microbiota. Several factors have been described to cause fluctuation in the gut microbiome, particularly in the first year of life, including birth mode, gestational age and birth weight, postpartum feeding mode, exposure to antibiotics in early life and environmental factors. Recent data also suggest the occurrence of colonization *in utero*. Gut microbiota plays a central role in health, intervening in the development of key metabolic and immunological functions of the host during childhood. Changes or imbalances in functions or patterns of the early gut microbiota (dysbiosis) are associated with numerous disease processes in the infant (e.g., necrotizing enterocolitis, childhood obesity, atopy and asthma, autism spectrum disorders, etc.), with an impact on adult susceptibility to the disease.

**Conclusion:** The first 1000 days after conception, which are considered a “window of opportunity”, are crucial for the development and health of the infant and the future adult. The investigation of the human gut microbiota is in full development and there is recent evidence of its role in human physiology and its association with different pathologies, which can be prevented and/or treated by microbial modulation.



**Keywords:** *“gut microbiota”, “infant gut colonization”, “gut immunity”, “microbiota-gut-brain axis”, “intestinal dysbiosis”*

## LISTA DE ABREVIATURAS

5HT	5-hidroxitriptamina
16S rRNA	RNA ribossomal 16S
ACTH	Hormona adrenocorticotrófica
AGCC	Ácidos gordos de cadeia curta
AMPK	Proteína quinase ativada pela adenosina monofosfato
cAMP	Adenosina monofosfato cíclico
CARD-FISH	Hibridação fluorescente <i>in situ</i> com deposição de repórter catalisado
CD	Célula dendrítica
CFTR	Regulador de condutância transmembrana em fibrose cística
CRH	Hormona libertadora de corticotrofina
DGGE	Eletroforese em gel com gradiente de desnaturação
DII	Doença inflamatória intestinal
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EC	Célula tipo enterocromafim
eCB	Sistema endocanabinoide
ECN	Enterocolite necrosante
FIAF	Fator adipocitário induzido pelo jejum
FISH	Hibridação fluorescente <i>in situ</i>
FUT	Fucosiltransferase
GABA	Ácido $\gamma$ -aminobutírico
GALT	Tecido linfóide associado ao intestino
GLP-1	Peptídeo-1 similar ao glucagon
GPR	Recetor acoplado à proteína G
HMO	Oligossacarídeos do leite materno
HPA	Hipotálamo-hipófise-suprarrenal (eixo)
IFN	Interferão
Ig	Imunoglobulina
IGF	Fator de crescimento semelhante à insulina-1
IL	Interleucina
IMC	Índice de massa corporal
ITS	Espaçador internamente transcrito
LPL	Lipoproteína lipase
LPS	Lipopolissacarídeo
MEFV	Gene da Febre Mediterrânica Familiar
MMP	Metaloproteinase da matriz
NF- $\kappa$ B	Fator de transcrição nuclear $\kappa$ B
NMDA	N-metil-D-aspartato
NOD	Domínio de oligomerização de ligação de nucleotídeos
PAI	Profilaxia antibiótica intraparto
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PEA	Perturbação do espectro do autismo
PRR	Recetores de reconhecimento de padrões
PSA	Polissacarídeo A
PYY	Peptídeo tirosina-tirosina
RISA	Análise do espaçador intergénico do rRNA
RNA	Ácido ribonucleico
SGB	<i>Streptococcus</i> $\beta$ -hemolítico do grupo B
sIgA	Imunoglobulina secretora A
SNC	Sistema nervoso central
SNE	Sistema nervoso entérico

TGF	Fator de crescimento transformador
TGI	Trato gastrointestinal
TGR	Recetor de ácidos biliares
Th	Célula T <i>helper</i> ou T auxiliar
TJ	Junção <i>tight</i> ou ocludente
TLR	Recetor do tipo Toll
TNF	Fator de necrose tumoral
Treg	Célula T reguladora
T-RFLP	Polimorfismo de comprimento de fragmentos terminais de restrição
TRPV	Recetor de potencial transiente vanilóide
UTO	Unidade taxonómica operacional

## ÍNDICE

AGRADECIMENTOS.....	i
RESUMO .....	iii
ABSTRACT .....	v
LISTA DE ABREVIATURAS.....	vii
LISTA DE TABELAS.....	x
LISTA DE FIGURAS.....	xi
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. OBJETIVOS.....</b>	<b>3</b>
<b>1.2. METODOLOGIA .....</b>	<b>3</b>
<b>2. MICROBIOTA INTESTINAL .....</b>	<b>4</b>
<b>2.1. COMPOSIÇÃO E DIVERSIDADE DO MICROBIOTA INTESTINAL .....</b>	<b>4</b>
<b>2.2. MÉTODOS DE ANÁLISE PARA PESQUISA E CARACTERIZAÇÃO DO MICROBIOMA INTESTINAL .....</b>	<b>6</b>
<b>2.3. DINÂMICA DA COLONIZAÇÃO INTESTINAL EM IDADE PEDIÁTRICA .....</b>	<b>7</b>
<b>2.4. ESTABELECIMENTO E DESENVOLVIMENTO DA MICROBIOTA INTESTINAL EM IDADE PEDIÁTRICA.....</b>	<b>12</b>
<b>2.5. FATORES MODULADORES DA COMPOSIÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL EM IDADE PEDIÁTRICA.....</b>	<b>13</b>
2.5.1. POTENCIAL TRANSFERÊNCIA MATERNO-FETAL DA MICROBIOTA .....	13
2.5.1.1. FATORES MATERNOS .....	16
2.5.2. GENÉTICA DO HOSPEDEIRO .....	18
2.5.3. VIA DE NASCIMENTO .....	20
2.5.4. IDADE GESTACIONAL .....	20
2.5.5. MODO DE ALIMENTAÇÃO .....	20
2.5.6. EXPOSIÇÃO A ANTIBIÓTICOS .....	20
2.5.7. EXPOSIÇÃO A PREBIÓTICOS E PROBIÓTICOS .....	23
2.5.8. MEIO AMBIENTE ENVOLVENTE.....	24
<b>2.6. PAPEL DA MICROBIOTA INTESTINAL <i>EARLY-LIFE</i> NA PROGRAMAÇÃO DA SAÚDE FUTURA .....</b>	<b>25</b>
2.6.1. DESENVOLVIMENTO DO SISTEMA IMUNOLÓGICO.....	26
2.6.2. FUNÇÕES METABÓLICAS ESSENCIAIS.....	29
2.6.3. FUNÇÕES DE DEFESA DO HOSPEDEIRO .....	32
2.6.4. FUNÇÕES ESTRUTURAIS E HISTOLÓGICAS .....	33
2.6.5. EIXO MICROBIOTA-INTESTINO-CÉREBRO.....	34
<b>3. BIOMARCADORES MICROBIANOS ASSOCIADOS À SAÚDE EM IDADE PEDIÁTRICA.....</b>	<b>37</b>
<b>4. DISBIOSE INTESTINAL E PATOLOGIAS ASSOCIADAS EM IDADE PEDIÁTRICA .....</b>	<b>38</b>
<b>5. CONCLUSÃO .....</b>	<b>39</b>
<b>6. APÊNDICE .....</b>	<b>42</b>
<b>7. BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>78</b>

## LISTA DE TABELAS<sup>1</sup>

<b>Tabela I.</b> Modelos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> da microbiota intestinal humana - potenciais e limitações ....	42
<b>Tabela II.</b> Técnicas disponíveis para a caracterização da microbiota intestinal humana .....	43
<b>Tabela III.</b> Fases de colonização do intestino em idade pediátrica .....	44
<b>Tabela IV.</b> Fatores do estilo de vida moderno associados, potencialmente, a alterações na microbiota intestinal em idade pediátrica .....	45
<b>Tabela V.</b> Benefícios do leite materno na colonização intestinal do lactente .....	46
<b>Tabela VI.</b> Fatores imunológicos e microbianos presentes no leite materno .....	47
<b>Tabela VII.</b> Compostos neuroativos detetados na microbiota intestinal .....	48
<b>Tabela VIII.</b> Condições clínicas que potenciam uma colonização intestinal atípica em idade pediátrica .....	49
<b>Tabela IX.</b> Disbiose intestinal associada a patologias em idade pediátrica .....	50
<b>Tabela X.</b> Microbiota intestinal alterada na DII em idade pediátrica .....	51
<b>Tabela XI.</b> Exposições perinatais potenciadoras do desenvolvimento de asma por perturbação da colonização microbiana intestinal .....	52

---

<sup>1</sup> As tabelas apresentadas nesta dissertação foram adaptadas de artigos consultados, com a autorização expressa dos autores, enviada via e-mail. Documentos fornecidos a pedido.

## LISTA DE FIGURAS<sup>2</sup>

<b>Figura 1.</b> Características do TGI (pH, secreções, populações bacterianas e contagem de células) e localização das populações bacterianas intestinais .....	54
<b>Figura 2.</b> Comparação entre o microbioma bacteriano e o viroma intestinal nas idades pediátrica e adulta .....	55
<b>Figura 3.</b> Desenvolvimento do <i>core</i> microbiota intestinal .....	56
<b>Figura 4.</b> Visão global das etapas bioinformáticas para obtenção do perfil microbiano do gene 16S rRNA e da metagenômica <i>shotgun</i> .....	57
<b>Figura 5.</b> <i>Turnover</i> composicional sistemático na microbiota intestinal humana .....	58
<b>Figura 6.</b> Estádios de colonização microbiana do intestino do neonato e do lactente .....	59
<b>Figura 7.</b> <i>Core</i> microbiota bacteriana do intestino em idade pediátrica .....	60
<b>Figura 8.</b> Evolução e expansão da microbiota intestinal precoce e os eventos que influenciam a sua composição .....	61
<b>Figura 9.</b> Modelação da microbiota intestinal em idade pediátrica, com ilustração de potenciais perturbações .....	62
<b>Figura 10.</b> Principais fatores determinantes do desenvolvimento da microbiota intestinal em idade pediátrica .....	63
<b>Figura 11.</b> Fatores do estilo de vida moderno associados ao desenvolvimento da microbiota intestinal em idade pediátrica, com consequências na saúde futura .....	64
<b>Figura 12.</b> Representação esquemática dos conceitos opostos que explicam a aquisição precoce da microbiota intestinal .....	65
<b>Figura 13.</b> Principais géneros bacterianos em locais maternos, uterinos e fetais, exemplificando possíveis origens para a colonização do intestino fetal .....	66
<b>Figura 14.</b> Locais maternos que podem, potencialmente, contribuir para a microbiota intestinal da descendência .....	67
<b>Figura 15.</b> Transmissão de microrganismos ao neonato pelo aleitamento materno .....	68
<b>Figura 16.</b> Principais funções benéficas da microbiota intestinal humana .....	69
<b>Figura 17.</b> Complexa <i>network</i> de contribuições da microbiota intestinal para a fisiologia do hospedeiro .....	70
<b>Figura 18.</b> Efeitos da microbiota intestinal na fisiologia do hospedeiro .....	71
<b>Figura 19.</b> Principais eventos que marcam o desenvolvimento do sistema imunológico e do intestino .....	72
<b>Figura 20.</b> Mecanismos do eixo microbiota-intestino-cérebro .....	73
<b>Figura 21.</b> Fatores predisponentes do desenvolvimento de enterocolite necrosante num intestino imaturo .....	74
<b>Figura 22.</b> Alteração da microbiota intestinal e das respostas imunológicas na DII .....	75
<b>Figura 23.</b> Diferentes mecanismos pelos quais a disbiose intestinal pode potenciar à obesidade .....	76

---

<sup>2</sup> As figuras apresentadas nesta dissertação foram adaptadas de artigos consultados, com a autorização expressa dos autores, enviada via e-mail. Documentos fornecidos a pedido.

## 1. INTRODUÇÃO

O corpo humano é visto como uma “ilha” ecológica,<sup>1</sup> abrigando milhões de microrganismos que funcionam sinergicamente com as células humanas e, por isso, podem influenciar os resultados em saúde ao longo da vida e, potencialmente, entre gerações.<sup>2</sup> Assim, a microbiota, conhecida também por microflora, é definida como uma comunidade complexa de espécies microbianas, incluindo bactérias, *Archaea*, eucariotas e vírus, que ocupa um determinado ecossistema. Por outro lado, o microbioma corresponde à totalidade dos microrganismos, dos seus genomas e das interações num ambiente definido.<sup>3</sup> Embora esta enorme variedade de microrganismos floresça na pele, na cavidade oral e no trato urogenital, aqueles que habitam os intestinos são os mais diversos e abundantes, com funções melhor compreendidas.<sup>2</sup> Portanto, o intestino humano é colonizado por  $10^{14}$  bactérias e muitos outros microrganismos, (*Archaea*, vírus e fungos),<sup>4</sup> compreendendo mais de 1000 espécies bacterianas comensais, cuja maioria sobrevive num ambiente anaeróbico,<sup>3</sup> mantendo um estado de eubiose marcada pela tolerância oral a bactérias comensais e a antigénios benignos.<sup>2</sup> Neste contexto, o microbioma pode exceder o número total de genes humanos por um fator próximo de 100.<sup>5</sup> Adicionalmente, estima-se que  $10^{11}$  a  $10^{12}$  células bacterianas são eliminadas por cada grama de fezes.<sup>6</sup>

O trato gastrointestinal (TGI), praticamente estéril, é rápida e imediatamente colonizado ao nascimento,<sup>7,8</sup> sendo a composição da microbiota intestinal comparativamente simples durante a amamentação, tornando-se complexa após o início do desmame e permanecendo estável até à velhice.<sup>7</sup> A origem desses microrganismos intestinais torna-se um tópico de relevante interesse, já que evidências crescentes indicam que a colonização intestinal em condições ideais, resulta numa relação simbiótica entre os microrganismos colonizadores e os tecidos epiteliais e linfóides do intestino,<sup>9</sup> afetando significativamente a saúde do hospedeiro.<sup>7</sup> Estudos cumulativos sugerem ainda que esta colonização intestinal precoce fornece um vasto estímulo microbiano, levando a mudanças profundas no desenvolvimento da barreira mucosa e do sistema imunológico da mucosa.<sup>10</sup> Portanto, a microbiota intestinal é um ecossistema complexo com ampla atividade metabólica e funciona como um verdadeiro “órgão oculto”,<sup>4</sup> o qual co-evoluiu em proximidade com o seu hospedeiro ao longo do tempo, estabelecendo uma relação simbiótica para alcançar a homeostasia intestinal fisiológica. Desta forma, o hospedeiro fornece um ambiente enriquecido em nutrientes e a microbiota fornece funções essenciais,<sup>3</sup> pelo que o ser humano pode ser considerado como um superorganismo constituído por componentes humanos e microbianos.<sup>5</sup>

Após a colonização completa do TGI, desde o nascimento até sensivelmente aos 2-3 anos de idade, a homeostasia imunológica é alcançada e a composição microbiana intestinal mantém-se estável ao longo do tempo, sendo única para cada indivíduo, sendo as características altamente conservadas em termos de composição *phyla* e dos grandes grupos filogenéticos, já que mais de

95% pode ser atribuída a quatro *phyla* principais<sup>4</sup> - Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria e Proteobacteria.<sup>3</sup> Por outro lado, estudos evidenciaram a existência de um viroma entérico com a presença de diversos bacteriófagos no intestino em idade pediátrica, sendo esporadicamente encontrados vírus que infetam células eucarióticas.<sup>11,12</sup>

Inúmeras variáveis na *early life* influenciam o processo complexo de colonização intestinal, incluindo o ambiente *in* útero, o modo de nascimento, a alimentação, a exposição a antibióticos, o ambiente físico envolvente e a genética do hospedeiro.<sup>5,13</sup> Está descrito ainda um fenómeno de resiliência, no qual, após um evento perturbador, há um reequilíbrio microbiano.<sup>3</sup> A trajetória do desenvolvimento inclui marcos como a colonização coreografada de populações bacterianas, alterações dinâmicas no viroma e interações entre os membros das duas comunidades.<sup>13</sup>

Como mencionado, a microbiota intestinal desempenha um papel indispensável no estado de saúde e na doença do hospedeiro, estando implicada em funções estruturais do intestino<sup>3</sup> e participando em inúmeras vias metabólicas fundamentais, como a fermentação de hidratos de carbono e proteínas, e o metabolismo de ácidos biliares e xenobióticos.<sup>4</sup> Por outro lado, desempenha funções protetoras por um efeito barreira que aumenta a resistência à colonização por patógenos oportunistas e pela excreção de peptídeos antimicrobianos.<sup>3</sup> Sob outra perspetiva, existe um sistema de comunicação bidirecional entre o TGI e o sistema nervoso, havendo evidências de que a microbiota intestinal possa desempenhar um papel crítico nessa comunicação. Uma variedade de mecanismos, incluindo vias imunológicas, neuronais e metabólicas, pode estar envolvida na modulação do eixo microbiota intestinal-cérebro.<sup>14</sup>

A composição e diversidade da microbiota, particularmente a intestinal, é essencial para a manutenção da homeostasia do hospedeiro.<sup>15</sup> No entanto, esta relação benéfica e o equilíbrio homeostático delicado pode ser interrompido pelo desequilíbrio da composição/função microbiana intestinal, conhecido como disbiose, com consequências funcionais importantes e implicação em inúmeras patologias na infância e na vida adulta,<sup>3,4</sup> das quais a enterocolite necrosante (ECN), a doença inflamatória intestinal (DII), a obesidade e as doenças atópicas constituem alguns exemplos.<sup>5</sup> Portanto, alterações no microbioma bacteriano e no viroma durante os primeiros anos de vida são significativas, podendo a primeira infância representar uma oportunidade única para compreender a microbiota intestinal, intervindo e influenciando o desenvolvimento do sistema imunológico e os *outcomes* da doença.<sup>13</sup> Não obstante, as bactérias intestinais evoluem dentro de um determinado nicho ecológico, em condições anaeróbicas e num contacto próximo com as células do sistema imunológico e ainda com partículas de alimentos e outros microrganismos. Este facto implica que a maioria das bactérias comensais do TGI humano não seja atualmente cultivável, de modo que o seu genoma não seja sequenciado e as funções dessas bactérias permaneçam desconhecidas.<sup>3</sup>



Avanços recentes em várias tecnologias moleculares e métodos computacionais tornaram possível uma abordagem metagenômica, na qual o conteúdo genômico bacteriano de um ecossistema e as funções poderão ser diretamente obtidos do ambiente, sem cultura.<sup>3</sup> Consequentemente, não apenas será possível elucidar sobre os mecanismos moleculares subjacentes às interações microbiota intestinal-hospedeiro, como também proporcionar novas possibilidades de prevenção e tratamento de patologias.<sup>5</sup> Assim, a promoção da saúde ou o controle de patologias mediante a manipulação da microbiota intestinal humana parece ser cada vez mais realista.<sup>5</sup>

### **1.1. OBJETIVOS**

Esta dissertação, elaborada na forma de um artigo de revisão bibliográfica, pretende analisar os principais fatores que contribuem para o desenvolvimento da microbiota intestinal durante a idade pediátrica, com foco particular no microbioma bacteriano. Por conseguinte, objetiva-se desenvolver os benefícios fisiológicos, a curto e a longo prazo, da relação simbiótica com o hospedeiro, bem como avaliar as implicações da disbiose no desenvolvimento da doença pediátrica e, futuramente, da doença no adulto.

### **1.2. METODOLOGIA**

Para a elaboração desta dissertação foi efetuada uma pesquisa abrangente mas sistemática da literatura médica na base de dados eletrónica Medline (PubMed) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>), utilizando os seguintes termos MeSH: *gut microbiota, infant colonization, childhood, immunity system, brain-gut axis, dysbiosis, microbiota-based therapeutics, fecal microbiota transplantation, prebiotics, probiotics*.

Os artigos científicos selecionados e sujeitos a uma leitura crítica abrangem datas de publicação entre 1992 e 2019, cuja triagem inicial deveu-se à leitura do *abstract* e da relevância dos objetivos estabelecidos. Algumas referências citadas foram retiradas dos artigos pré selecionados devido à pertinência para o tema e para o aprofundamento dos tópicos abordados. Como critério de inclusão/exclusão foi considerada a língua (inglês, francês e espanhol), selecionando apenas os artigos aos quais foi possível aceder na íntegra. No seguimento, foi dada preferência para estudos pré-clínicos, ensaios clínicos, estudos clínicos comparativos e estudos clínicos multicêntricos, embora por vezes houvesse o recurso pertinente a meta-análises e a revisões sistemáticas. A seleção dos estudos foi efetuada tendo por base, não só a atualidade do artigo, mas também a indexação do mesmo e o fator de impacto das revistas, avaliado através da plataforma Web of Knowledge ([www.webofknowledge.com](http://www.webofknowledge.com)).

## 2. MICROBIOTA INTESTINAL

### 2.1. COMPOSIÇÃO E DIVERSIDADE DO MICROBIOTA INTESTINAL

A microbiota intestinal é composta por um amplo espectro de microrganismos, ainda não completamente explorado,<sup>16</sup> mas as suas ações coordenadas são consideradas importantes para a vida humana, uma vez que influenciam quer a fisiologia normal, quer a suscetibilidade à doença.<sup>17</sup> Assim, a microbiota intestinal humana é constituída por microrganismos autóctones ou indígenas e por microrganismos alóctones ou transientes. Neste contexto, apenas um número relativamente pequeno de agentes patogénicos (oportunistas) é considerado como integrante da microbiota entérica do hospedeiro, sobrevivendo localmente de forma não perturbada.<sup>1</sup> Estes microrganismos podem pertencer a qualquer um dos três domínios da vida – Eubacteria, Archaea e Eukarya, incluindo ainda vírus, e estabelecem relações tróficas complexas entre si e o seu hospedeiro humano, variando de simbiose ao parasitismo.<sup>18</sup> A superfície da mucosa intestinal apresenta uma significativa concentração vírica e uma elevada razão vírus/bactéria, em comparação com os ambientes adjacentes, como o lúmen intestinal e as fezes.<sup>19</sup>

Sete *phyla* bacterianos constituem a microbiota intestinal – Firmicutes, Bacteroides, Proteobacteria, Fusobacteria, Verrucomicrobia, Cyanobacteria e Actinobacteria, com maior abundância dos 2 primeiros *phyla* mencionados.<sup>20</sup> As comunidades bacterianas exibem variações qualitativas e quantitativas ao longo do TGI devido a fatores do próprio hospedeiro (por ex.: pH, tempo de trânsito, níveis de oxigénio/estado redox, ácidos biliares, enzimas digestivas e muco), a fatores externos (por ex.: disponibilidade de nutrientes, medicação e fatores ambientais - temperatura) e a fatores bacterianos (por ex.: capacidade de adesão, enzimas e capacidade metabólica)<sup>20,21</sup> (Figura 1). A maioria das bactérias comensais habita na parte inferior do TGI, particularmente no cólon, visto que o trato superior contém níveis elevados de secreções ácidas, biliares e pancreáticas, as quais são tóxicas para a maioria dos microrganismos. Adicionalmente, está documentada uma atividade motora propulsora física do TGI superior que impede qualquer colonização bacteriana estável.<sup>22</sup> Portanto, o estômago e o duodeno acolhem um número muito baixo de microrganismos, com menos de 1000 células bacterianas por grama de conteúdo, predominando *Lactobacillus* spp. e *Streptococcus* spp.<sup>23</sup> Por outro lado, verifica-se um aumento gradual do número de bactérias, de  $10^4$  para aproximadamente  $10^7$  por grama de conteúdo, desde o jejuno até ao íleo distal. Um vez no cólon, o trato é densamente colonizado por microrganismos anaeróbios, com um conteúdo luminal até  $10^{12}$  células por grama.<sup>22</sup> *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Eubacterium*, *Clostridium*, *Peptococcus*, *Peptostreptococcus* e *Ruminococcus* compõem os géneros anaeróbios estritos dominantes, enquanto que *Escherichia*, *Enterobacter*, *Enterococcus*, *Klebsiella*, *Lactobacillus* e *Proteus* estão entre os principais géneros bacterianos anaeróbios facultativos.<sup>24</sup>

Por outro lado, as fezes humanas contêm, pelo menos,  $10^9$  partículas vírus-like por grama, sendo a maioria identificada como bacteriófagos, embora estejam ainda incluídos vírus que infetam células eucarióticas, vírus que parasitam *Archaea*, profagos, retrovírus endógenos e outros elementos virais endógenos.<sup>25</sup> Em amostras fecais humanas foram determinados cerca de 1200 virotipos diferentes, os quais pertencentes, na sua maioria, à família *Siphoviridae*, seguidos por membros da família *Podoviridae*.<sup>26</sup> Todavia, o tamanho do viroma intestinal humano ainda não é totalmente conhecido, já que tem sido escassamente explorado.<sup>27</sup> Entre os vírus ácido desoxirribonucleicos (DNA) do viroma intestinal humano, foram reconhecidos, além dos bacteriófagos, os denominados “vírus gigantes” (> 300 kb; *Mimiviridae*, *Mamaviridae*, *Marseilleviridae*, *Poxviridae*, *Iridoviridae*, *Ascoviridae*, *Phycodnaviridae* e *Asfaviridae*).<sup>28</sup> No que concerne aos vírus ácido ribonucleicos (RNA) eucariontes no jejuno-íleo e no cólon, foram detetados *Rotavirus*, *Astrovirus*, *Calicivirus*, *Norovirus*, vírus da hepatite E, *Coronavirus*, *Torovirus* e *Adenovirus* (serotipos 40 e 41).<sup>27</sup> Complementarmente, podem ser detetados, não apenas vírus humanos totalmente adaptados, mas também vírus animais transmitidos pela ingestão de alimentos contaminados, com uma relação pouco clara com o viroma humano.<sup>29</sup> Neste aspeto, é sugerido que o estado imunológico do hospedeiro desempenha um papel fundamental na determinação das características clínicas e na composição do viroma.<sup>30</sup> Em alguns estudos ficou demonstrada uma excreção persistente ou intermitente de vírus entéricos em crianças menores de 5 anos, sem qualquer evidência de doença associada como, por exemplo, a excreção de *Enterovirus* humano,<sup>31</sup> *Parechovirus*<sup>32</sup>, *Anellovirus* e *Picobirnavirus*, entre outros.<sup>33</sup>

Do nascimento até cerca dos 2 anos de idade, o viroma eucariótico e o microbioma bacteriano expandem-se, mas esse período é acompanhado por uma redução e alteração na composição do viroma bacterifágico.<sup>12</sup> A composição do viroma intestinal reflete a evolução da microbiota bacteriana em idade pediátrica, a qual permanece, provavelmente, estável ao longo do tempo e altamente personalizada.<sup>34</sup> Por outro lado, foi determinado que as interações entre vírus e bactérias podem influenciar a saúde e a doença do hospedeiro.<sup>35</sup> A imunidade antiviral intestinal depende da sinalização bacteriana Gram-negativa<sup>36</sup> e, inversamente, a infeção viral entérica protege contra danos intestinais e bactérias patogénicas.<sup>37</sup> A microbiota bacteriana intestinal também pode promover a replicação de vírus entéricos (ex.: poliovírus, vírus do tumor mamário, norovírus, reovírus e rotavírus), verificado em estudos com ratinhos.<sup>37-39</sup> Potencialmente, os bacteriófagos alteram a estrutura do microbioma bacteriano por meio de relações predador-presa, o que foi observado no intestino em idade pediátrica entre espécies de *Bifidobacterium* spp. e prófagos.<sup>40</sup>

Noutra instância, Goodrich *et al.* (2014) demonstrou que a genética do hospedeiro humano influencia fortemente a composição do microbioma intestinal.<sup>41</sup> Embora a diversidade dos

microbiomas intestinais possa diferir acentuadamente nos indivíduos adultos,<sup>42</sup> é observado com frequência que os membros de uma determinada família apresentam microbiomas mais semelhantes do que pessoas não relacionadas.<sup>43,44</sup> Este facto deve-se, provavelmente, ao maior grau de identidade genética que as pessoas relacionadas compartilham,<sup>41</sup> embora algumas semelhanças familiares sejam atribuídas a influências ambientais partilhadas, como o tipo de alimentação.<sup>45</sup> Além disso, Goodrich *et al.* (2014) demonstrou que fatores ambientais modelam, particularmente, a comunidade Bacteroidetes,<sup>41</sup> sendo consistente com o estudo de gémeos monozigóticos de Simões *et al.* (2013), no qual foram verificados níveis mais semelhantes de *Bacteroides spp.* em gémeos cujas dietas eram idênticas.<sup>46</sup> Consequentemente, são necessários mais estudos para compreender se os taxa hereditários coexistentes interagem de forma sintrófica, ou se simplesmente respondem de modo idêntico a estímulos ambientais no intestino, influenciados pelo hospedeiro.<sup>41</sup> No que respeita ao viroma intestinal da criança, o grau de influência genética é praticamente desconhecido e embora se reconheça uma elevada variabilidade interindividual,<sup>11,12,26,47</sup> estudos em gémeos encontraram uma variabilidade limitada, sendo os viromas intestinais durante a infância mais semelhantes entre gémeos do que em crianças não relacionadas.<sup>11,12</sup> Além de que o contacto próximo possa ser um fator de partilha do viroma intestinal, fatores dependentes da idade serão determinantes da sua composição, uma vez que Reyes *et al.* (2015) demonstrou que os viromas intestinais de gémeos em idade pediátrica são altamente semelhantes mas distinguíveis dos da mãe ou de irmãos mais velhos.<sup>11</sup> Pelo contrário, Reyes *et al.* (2010) comprovou que gémeos adultos abrigam viromas intestinais substancialmente diferentes dos do seu par gémeo ou da mãe.<sup>26</sup> Portanto, é plausível, que fatores ambientais (como a dieta, a geografia e a exposição) possam ter uma influência cada vez maior na variabilidade do viroma com o aumento da idade.

## **2.2. MÉTODOS DE ANÁLISE PARA PESQUISA E CARACTERIZAÇÃO DO MICROBIOMA INTESTINAL**

O estudo da microbiota intestinal humana envolve a determinação do perfil taxonómico (informações sobre as identidades e abundâncias de diferentes microrganismos no ecossistema) e do perfil funcional (informações sobre o conteúdo total de genes da comunidade microbiana e a abundância de transcritos, proteínas e metabolitos), considerando ainda modelos animais gnotobióticos (*germ-free*, i.e., animais desprovidos de microbiota intestinal, ou intencionalmente colonizados por uma estirpe/comunidade bacteriana selecionada), os quais fornecem um meio para conectar organismos e funções específicas, com a expressão de determinados fenótipos (Tabelas I e II).<sup>48</sup>

Anteriormente, o conhecimento da microbiota intestinal humana estava limitado a espécies cultiváveis *in vitro*,<sup>49</sup> sendo que mais de 80% das bactérias fecais não podem ser cultivadas em

meios de cultura padrão,<sup>50,51</sup> já que são nutricionalmente muito exigentes e, por isso, não são detetáveis por este método.<sup>52</sup> Por consequência, foram desenvolvidas técnicas moleculares de alto rendimento, independentes da cultura microbiológica de rotina, o que revolucionou os estudos que visavam identificar e quantificar a composição da microbiota intestinal. Para a determinação qualitativa, técnicas como *fingerprinting* (sistema de eletroforese em gel com gradiente de desnaturação - DGGE), polimorfismo de comprimento de fragmentos terminais de restrição (T-RFLP), sequenciação do gene RNA ribossomal 16S (16S rRNA) e a análise do espaçador intergénico do rRNA (RISA) são amplamente utilizadas.<sup>50</sup> Em questões quantitativas, a hibridação fluorescente *in situ* (FISH), reação em cadeia da polimerase (PCR),<sup>52</sup> hibridação fluorescente *in situ* com deposição de repórter catalisado (CARD-FISH) e hibridação *in situ* com microscopia eletrónica de varrimento constituem, ainda hoje, uma referência.<sup>50,53</sup> Contudo, a análise do perfil microbiano baseada no gene 16S rRNA, presente em todos os procariontes e com domínios tanto conservados quanto variáveis, representa a metodologia *standard* atual para caracterizar ecossistemas microbianos complexos.<sup>54</sup> As leituras são obtidas da plataforma *Next-generation Sequencing* e processadas usando pipelines bioinformáticos (ex.: *software* QIIME™ ou Mothur),<sup>1</sup> possibilitando a atribuição de identidade para membros desconhecidos/não cultiváveis, mediante a discriminação baseada nas sequências únicas de regiões hipervariáveis.<sup>55</sup> Todavia, a análise de perfis microbianos baseada no gene 16S rRNA apenas fornece informações sobre a composição da microbiota num nível taxonómico superior ao da espécie,<sup>56</sup> pelo que o espaçador internamente transcrito (ITS; região espaçadora entre os genes 16S rRNA e 23S rRNA dentro do locus de rRNA) constitui um marcador molecular mais variável ao nível interespecie.<sup>57</sup>

Não obstante, as técnicas mencionadas não fornecem informação sobre a função génica, pelo que o advento da metagenómica baseada na sequenciação *shotgun* possibilitou a investigação de aspetos funcionais de genes, como genes de resistência a antibióticos<sup>58</sup> e marcadores associados à doença,<sup>59</sup> embora não permita prever se há, ou não, expressão de genes num determinado momento.<sup>1</sup> A construção de bibliotecas metagenómicas proporcionou a compreensão da dinâmica da comunidade microbiota com o hospedeiro,<sup>50</sup> com informações taxonómicas sobre a identidade ao nível da estirpe.<sup>60</sup> Em contrapartida, surgiram outras abordagens “ómicas”, incluindo a metatranscriptómica, a metaproteómica e a metametabolómica, as quais apresentam-se como ferramentas de análise úteis para investigar identidades, atividades e papéis funcionais dos membros não cultiváveis da microbiota intestinal (*Figura 4*), explorando conexões entre a microbiota e a saúde do hospedeiro e identificando biomarcadores de doença.<sup>61,62</sup> Em paralelo, a bioinformática é empregue para organizar e relacionar a informação biológica recolhida.<sup>63</sup>

Entretanto, a genómica unicelular é aplicada para explorar espécies raras de comunidades microbianas e revelar as funções de micróbios específicos,<sup>64</sup> visto que espécies pouco abundantes ou com conteúdo genómico escasso são, frequentemente, negligenciadas por leituras limitadas.<sup>65</sup>

Independentemente do referido, os métodos de análise baseados na sequenciação génica refletem apenas a abundância relativa de cada táxon e negligenciam a alteração global da carga microbiana na análise comparativa entre as amostras, podendo não evidenciar a diferença real ou revelar a interação entre o hospedeiro e a microbiota.<sup>66</sup> Portanto, a cultura microbiológica pura prossegue como a abordagem mais direta e precisa para o estudo das características fisiológicas e genéticas. Nos últimos anos, alguns investigadores empregaram um método designado culturómica, o qual aplica condições de cultivo de alta produtividade, mimetizando as condições ambientais dos organismos e identificando colónias por espectrometria de massa,<sup>67</sup> revelando espécies residentes no intestino humano, anteriormente não identificadas.<sup>68</sup>

### 2.3. DINÂMICA DA COLONIZAÇÃO INTESTINAL EM IDADE PEDIÁTRICA

Durante a primeira infância, ocorre uma expansão do microbioma intestinal bacteriano, com mudanças repentinas e profundas na sua composição.<sup>69</sup> Portanto, nas etapas iniciais de colonização, a microbiota intestinal pode sofrer o fenómeno súbito de sucessão microbiana (*Figura 5*), o qual continuará até a criança completar 2 a 3 anos de idade, momento em que a microbiota atinge uma composição estável e semelhante à de uma microbiota adulta.<sup>44</sup> Por conseguinte, a microbiota fecal do lactente (particularmente quando < a 1 ano de idade) apresenta uma baixa diversidade bacteriana e vírica,<sup>70,71</sup> mas uma estrutura altamente dinâmica (*Figura 6*). Cerca de 1000 unidades taxonómicas operacionais (UTO's) são detetadas no primeiro ano de vida, em comparação com as quase 2000 UTO's verificadas em idades posteriores.<sup>72</sup> Assim, a elevada diversidade  $\beta$  da microbiota inicial (i.e. mudança de espécies ao longo de um gradiente ambiental) fica reduzida por volta dos 12 meses de idade, ao contrário da diversidade  $\alpha$  (i.e. número total de espécies num *habitat*) que aumenta em função do tempo, demonstrando que o ecossistema intestinal da criança torna-se mais complexo e estável ao longo do tempo, enquanto a diversidade interindividual diminui progressivamente para aquela típica do adulto.<sup>69</sup> Em vista disso, a microbiota intestinal do adulto saudável apresenta uma elevada diversidade, é específica de cada indivíduo e mantém-se, relativamente, estável ao longo do tempo<sup>73</sup> para bactérias<sup>74,75</sup>, vírus<sup>26</sup> e células eucariotas,<sup>76</sup> sendo resiliente à mudança.<sup>26,34</sup>

Anteriormente, considerava-se que tanto o ambiente intrauterino quanto o feto permaneciam estéreis até o parto. Contudo, na atualidade existem indícios de exposição microbiana pré-parto, já que foram detetadas bactérias na placenta, no cordão umbilical, no líquido amniótico e no mecónio de neonatos saudáveis,<sup>77</sup> embora com um número e diversidade

reduzidos.<sup>70</sup> A ausência de partículas virais detetáveis nas primeiras amostras fecais de recém-nascidos pressupõe que o viroma intestinal é, predominantemente, adquirido no pós-natal.<sup>78</sup> Portanto, logo após o nascimento, o neonato é exposto a elevados níveis microbianos e o seu intestino sofre uma rápida colonização por novos microrganismos provenientes da progenitora (do canal vaginal ou da superfície cutânea, dependendo da via de nascimento)<sup>51,79</sup> e do meio ambiente circundante. No período pós-natal imediato e em condições saudáveis, microrganismos anaeróbios facultativos (ex.: *Escherichia coli* e *Enterococcus* spp.<sup>80</sup>) e microrganismos aerotolerantes dominam o ecossistema intestinal, reduzindo os níveis locais de oxigênio para facilitar a proliferação subsequente de uma comunidade complexa de bactérias anaeróbias estritas (ex.: *Bifidobacterium* spp., *Lactobacillus* spp., *Bacteroides* spp., *Clostridium* spp. e, por vezes, *Ruminococcus* spp.<sup>80</sup>).<sup>12,69,70,81,82</sup> Por outro lado, Breitbart *et al.* (2008) verificou que a diversidade da comunidade viral intestinal é extremamente baixa durante a primeira semana de vida, na sua maioria bacteriófagos, com evolução para 10<sup>8</sup> partículas virais por grama de fezes no final desta primeira semana. O viroma intestinal altera rapidamente entre a primeira e a segunda semanas de idade e o seu repertório expande-se em diversidade e número nos primeiros 3 meses de vida,<sup>78</sup> com uma abundante e diversa comunidade de bacteriófagos pertencente, sobretudo, à ordem taxonômica Caudovirales. No entanto, este viroma bacteriofágico, subsequentemente, contrai-se e diminui em riqueza, tornando-se uma comunidade dominada por Microviridae nos primeiros 2 anos de vida.<sup>11,12</sup> Embora as mudanças dinâmicas no viroma bacteriofágico possam ser generalizáveis ao longo do desenvolvimento da criança, é possível que as mudanças específicas na sua composição possam ser, significativamente, influenciadas por fatores como a geografia e a dieta. Com frequência, são ainda detetados vírus que infetam células eucarióticas entéricas (ex.: famílias Picornaviridae, Adenoviridae, Astroviridae, Anelloviridae, Reoviridae and Caliciviridae) em lactentes, com distribuição esporádica ao longo do tempo e persistência limitada durante o desenvolvimento inicial.<sup>12,33,83</sup> Pelo referido, compreende-se que o viroma intestinal da criança se desenvolve em paralelo com o microbioma bacteriano, havendo evidência de que a comunidade de bacteriófagos é maior nos primeiros meses de vida, mas contrai-se à medida que as comunidades bacterianas se expandem e se diversificam. De um modo geral, o microbioma transita de uma comunidade com elevada diversidade bacteriofágica *versus* baixa diversidade bacteriana no início de vida para uma comunidade com baixa diversidade bacteriofágica *versus* alta diversidade bacteriana aos 24 meses de idade.<sup>12</sup> Assim, pressupõe-se que os bacteriófagos possam desempenhar um papel protetor no nicho ecológico intestinal livre do recém-nascido, selecionando contra a colonização bacteriana aberrante e coordenando a aquisição de bactérias benéficas ao longo do desenvolvimento,<sup>12</sup> através de sua capacidade em provocar a lise e morte das bactérias hospedeiras<sup>84</sup> e, por isso, o genótipo de fago mais abundante não será o mesmo em momentos

distintos.<sup>78</sup> Enquanto que a imunidade intestinal antiviral está dependente da sinalização pelo fator de transcrição nuclear  $\kappa B$  (NF- $\kappa B$ ) das bactérias comensais gram-negativas, a colonização viral entérica protege contra danos intestinais e bactérias patogênicas. Além disso, os fagos funcionam como um veículo para a transferência horizontal de genes, podendo influenciar a evolução, a diversidade e o metabolismo bacterianos. Assim, a interação transdomínios acrescenta uma camada de complexidade à homeostasia microbiota-hospedeiro.<sup>84</sup>

A existência de um *core* microbiota de UTO's em neonatos de termo (*Figura 7*), independentemente da via de nascimento e do estágio de lactação, sugere a existência de comunidades altamente especializadas que atuam como colonizadores primordiais das *networks* microbianas, num processo dirigido por nicho.<sup>82</sup> Em contrapartida, o aumento gradual da diversidade filogenética ao longo do tempo é pontuado por mudanças significativas na composição taxonômica da microbiota associada a eventos de vida, como o uso de antibióticos e a introdução de alimentos sólidos. O entendimento sobre se essa diversidade adicional se desenvolve a partir do inóculo inicial ou deriva da exposição contínua aos progenitores, dieta e outras fontes ambientais, continua a ser alvo de estudo.<sup>70</sup> Avershina *et al.* (2016) propôs que as UTO's de colonização intestinal tardia (> 1-2 anos de idade) não são adquiridas ao nascimento, mas são recrutadas posteriormente num processo controlado por UTO's presentes até um ano de idade.<sup>85</sup> Por outro lado, Bäckhed *et al.* (2015) observou que a microbiota intestinal dos recém-nascidos é mais semelhante à da progenitora, em termos de composição e de função, quando têm um ano de idade do que numa idade mais precoce, apresentando aqui diferenças que aguardam maturação adicional.<sup>69</sup> A dinâmica do processo de colonização revela diferenças dependentes dos fatores perinatais presentes. Enquanto que nos recém-nascidos de termo, a via de nascimento e o tipo de alimentação (aleitamento materno *versus* leite de fórmula) representam os principais propulsores para o desenvolvimento da microbiota, em recém-nascidos pré-termo, a idade gestacional parece ter um maior impacto nesse contexto.<sup>69,86</sup> Por outro lado, a análise metagenômica revelou que o microbioma é enriquecido com genes precocemente, de modo a facilitar a utilização de lactatos pelo lactente, quer a sua dieta seja leite materno ou leite de fórmula. Um outro aspeto interessante abrange a capacidade funcional de utilizar glicanos derivados de plantas mesmo antes da introdução de alimentos sólidos, sugerindo que o intestino da criança prepara-se para a mudança da dieta não exclusiva em leite, antes que tal mudança ocorra.<sup>70</sup>

Em geral, considera-se como “*gold standard*”, o microbioma intestinal de lactentes nascidos de termo e por via vaginal, com aleitamento materno exclusivo e sem exposição prévia a antibióticos, direta ou indiretamente,<sup>87</sup> conduzindo à homeostasia imunológica e à ausência de doença.<sup>88</sup> Apesar disso, a definição de uma microbiota intestinal em idade pediátrica “*standard*”, “*normal*” ou “*saudável*” permanece intrincada, não só pela elevada instabilidade no início de vida



e pela alta variabilidade interindividual, mas também pela multiplicidade de fatores (pré-, peri- e pós-natais) que condicionam o seu estabelecimento (*Figura 8*), embora algumas tendências possam ser inferidas pelos diferentes estudos disponíveis. Enquanto que a microbiota intestinal adulta é dominada por membros dos *phyla* Firmicutes e Bacteroidetes, a microbiota intestinal neonatal é, inicialmente, representada por microrganismos pertencentes aos *phyla* Proteobacteria e Actinobacteria, com diversificação posterior pela emergência de Firmicutes e Bacteroidetes.<sup>1</sup> Jakobsson *et al.* (2014) verificou um crescimento inicial de Proteobacteria com declínio posterior e gradual desde a primeira semana até aos 24 meses de vida, enquanto que Actinobacteria atinge um pico aos 3 meses e Firmicutes expande-se a partir dessa idade.<sup>89</sup> Caracteristicamente, bactérias do género *Bifidobacterium* spp. são encontradas em quantidades elevadas nas fezes dos lactentes, sobretudo naqueles que são amamentados, sendo consideradas um membro chave da microbiota intestinal destes lactentes.<sup>90-93</sup> Por outro lado, estudos recentes demonstraram uma elevada ocorrência de enterobactérias em neonatos e lactentes de termo sujeitos a administração perinatal de antibióticos e naqueles nascidos pré-termo. Neste contexto, Arbolea *et al.* (2015) observou que bactérias da família Enterobacteriaceae dominam a microbiota intestinal durante as primeiras semanas de vida, seguidas por bactérias da família Bifidobacteriaceae como a segunda população microbiana, a qual amplifica ao longo do tempo com uma diminuição, concomitante, das enterobactérias.<sup>94</sup> Estes resultados foram concordantes com outros estudos, nos quais amostras fecais dos primeiros dias de vida apresentavam altos níveis de Enterobacteriaceae, enquanto que amostras fecais aos 6 meses possuíam uma dominância em *Bifidobacterium* spp., *Collinsella* spp. ou *Bacteroides* spp.<sup>95,96</sup> Membros do *phylum* Firmicutes também foram detetados em diferentes estudos, sempre com baixa abundância durante as primeiras semanas após o nascimento.<sup>94,96</sup> Curiosamente, tem sido demonstrado que bactérias deste *phylum*, pertencentes às famílias Staphylococcaceae, Clostridiaceae, Lachnospiraceae e Veillonellaceae, são mais abundantes em lactentes sob aleitamento materno do que naqueles sob leite de fórmula, cuja microbiota é dominada por enterobactérias até 6 meses.<sup>97,98</sup> De acordo com outros estudos recentes, o *phylum* Bacteroidetes parece estar presente desde os estádios iniciais após o nascimento, embora em níveis reduzidos,<sup>99,100</sup> com uma proporção, notavelmente, superior durante os primeiros 12 meses de vida de lactentes nascidos por via vaginal.<sup>89</sup> Recentemente, Cheng *et al.* (2015) demonstrou que a estabilização do *phylum* Bacteroidetes pode prolongar-se até aos 5 anos.<sup>101</sup>

De um modo geral, a natureza dinâmica do microbioma durante a primeira infância é significativa por, pelo menos, duas razões: (1) os passos na progressão do microbioma podem representar importantes marcos do desenvolvimento (ex.: motor, linguístico e emocional) que se correlacionam com a maturação funcional do sistema imunológico e do metabolismo do hospedeiro; (2) a primeira infância pode apresentar um período único e suscetível em que o

microbioma é alterável.<sup>69</sup> Estudos recentes indicam que os primeiros 1000 dias de vida constituem uma janela única em que o microbioma intestinal é mais influente no desenvolvimento imunológico e no *outcome* da doença.<sup>102-104</sup> Portanto, compreender a estabilidade da microbiota ao longo do tempo é um passo importante para permitir a previsão de estados de doença e desenvolver terapias para corrigir a disbiose.

#### 2.4. ESTABELECIMENTO E DESENVOLVIMENTO DA MICROBIOTA INTESTINAL EM IDADE PEDIÁTRICA

Como já mencionado anteriormente, durante a maturação da microbiota intestinal do lactente, o crescimento gradual da sua diversidade é intercalado por períodos de grandes mudanças na abundância relativa de grupos taxonômicos, as quais estarão relacionadas com determinados fatores e eventos de vida.<sup>70,93</sup> Este processo é dinâmico e não aleatório,<sup>85</sup> com uma sucessão coreografada de espécies bacterianas, ocorrendo interações positivas e negativas entre os principais taxa microbianos.<sup>85</sup> Num processo normal, com parto de termo por via vaginal, verificam-se as seguintes fases (*Tabela III*): **Fase 1** – período intrauterino com colonização parcial; **Fase 2** – ingestão de um bólus saudável de bactérias vaginais e colônicas provenientes da progenitora, na passagem pelo canal de parto.<sup>9,105</sup> As fontes primárias de *Lactobacillus* spp. no intestino em idade pediátrica serão as microbiotas vaginal e retal maternas, adquiridas durante o parto vaginal, dada a baixa frequência de detecção em amostras de mecônio de neonatos nascidos por cesariana;<sup>106</sup> **Fase 3** – proliferação bacteriana estimulada pela introdução à alimentação, sendo o tipo de leite um dos determinantes *major*; **Fase 4** – desmame para alimentos sólidos complementares; **Fase 5** – maturação completa da colonização intestinal, adquirindo a sua assinatura microbiana única para toda a vida (comunidade microbiana complexa de bactérias anaeróbicas residentes no intestino delgado distal e no cólon, principalmente).<sup>9,105</sup> Apesar de um padrão comum, a microbiota intestinal do lactente apresenta grandes diferenças interindividuais.<sup>44,70</sup> Cesariana *versus* parto vaginal<sup>107</sup> e aleitamento materno *versus* leite de fórmula<sup>108</sup> são determinantes importantes para o desenvolvimento microbiano e podem alterar os padrões de sucessão microbiana, com efeito a longo prazo.<sup>51,109,110</sup> Contribuintes menos evidentes, incluindo fatores maternos expressos na amamentação e fatores do hospedeiro, como a genética e as características intestinais (ex.: pH e resposta imunológica), são igualmente importantes.<sup>111</sup> A nutrição subsequente continua a orientar o desenvolvimento da microbiota intestinal do lactente, bem como a carga microbiana do ambiente envolvente (*Tabela IV*), a qual será determinada por condições que favoreçam a exposição a diferentes microrganismos (ex.: país de origem, condições de higiene, estilo de vida rural ou urbano, número de irmãos, frequência de creches e escolas, animais de estimação, etc.)<sup>112</sup> (*Figuras 9 e 10*). Todos esses fatores deverão ser considerados em relação às doenças para as quais se acredita que

a microbiota intestinal esteja envolvida<sup>109</sup> (Figura 11) Noutra instância, as respostas sistêmicas à microbiota comensal são essenciais para a manutenção das interações benéficas microbiota-hospedeiro. A título de exemplo, as IgA e IgG adquiridas verticalmente em ratinhos recém-nascidos medeiam respostas imunológicas atenuadas, dependentes de células T, contra as bactérias comensais.<sup>113</sup> Adicionalmente, foi demonstrado em ratinhos que respostas sistêmicas de IgG, adquiridas precocemente e ao longo da vida, fornecem uma proteção cruzada contra patógenos Gram-negativos, como *Escherichia coli* e *Salmonella* spp.<sup>114</sup> Neste contexto, está bem estabelecido que os primeiros eventos de colonização microbiana fornecem estímulos vitais ao recém-nascido, os quais guiam a sua maturação imunológica.<sup>115</sup>

## **2.5. FATORES MODULADORES DA COMPOSIÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL EM IDADE PEDIÁTRICA**

### **2.5.1. POTENCIAL TRANSFERÊNCIA MATERNO-FETAL DA MICROBIOTA**

O “paradigma do útero estéril” e, portanto, de um ambiente fetal humano estéril sob condições fisiológicas tornou-se um dogma aceite durante décadas. De acordo com este conceito, a colonização microbiana do trato intestinal de um neonato saudável inicia-se durante e após o nascimento, tanto pela microbiota vertical (microbiota materna perineal, vaginal e fecal), quanto pela horizontal. Todavia, a maioria dos estudos em que se baseia este paradigma empregou métodos tradicionais de cultura e microscopia, os quais falham em detetar microrganismos viáveis, mas não cultiváveis. Estudos mais recentes, utilizando técnicas independentes do cultivo, propõem uma aquisição da microbiota humana *in útero* - “hipótese da colonização *in útero*” (Figura 12),<sup>1</sup> corroborada pela identificação de uma microbiota na placenta, no líquido amniótico e no mecónio de recém-nascidos saudáveis de termo, com parto por via vaginal.<sup>116,117</sup> A interação da microbiota intrauterina com o feto em desenvolvimento é sugerida por estudos em animais *germ-free*, nos quais a função imunológica ao nascimento difere de animais convencionais recém-nascidos.<sup>118</sup> Contudo, escasseiam estudos em humanos para determinar a importância deste *crosstalk* bactéria-intestino no processo de pré-colonização e o seu impacto no desenvolvimento do intestino fetal.<sup>9</sup> No contexto da colonização da cavidade uterina durante uma gestação saudável, são consideradas, atualmente, duas vias principais, embora os mecanismos sejam ainda pouco compreendidos (Figura 13): (i) ascensão vertical da vagina e/ou do trato urinário; (ii) via hematogénica através da placenta, após a translocação a partir do trato digestivo materno (desde a cavidade oral até ao cólon distal).<sup>1</sup> Contudo, a análise dos estudos que sustentam esta hipótese deve ser efetuada com cautela, devido a limitações metodológicas inerentes: ausência de evidência de viabilidade bacteriana; limite de deteção das abordagens moleculares insuficiente para estudar populações

microbianas com uma baixa biomassa; e carência de controlos adequados para possíveis contaminações das amostras, com consequentes resultados falso-positivos.<sup>119</sup>

Apesar do mencionado, é amplamente aceite que a exposição do ambiente fetal a metabolitos e compostos microbianos (incluindo o DNA) da microbiota materna (*Figura 14*) possa ter um impacto importante no desfecho da gravidez e no desenvolvimento da criança.<sup>1</sup> A mulher grávida é considerada um ser holobionte (ecossistema complexo de células derivadas do hospedeiro juntamente com simbiontes microbianos estáveis e transitórios),<sup>120</sup> cujos microrganismos metabolizam ativamente nutrientes, enquanto que o sangue materno recebido pelo feto pode ser modificado, de forma significativa, pelas atividades metabólicas da microbiota da mãe.<sup>121</sup> Por consequência, mesmo assumindo-se o conceito de esterilidade do fetal, este estará exposto às associações simbióticas maternas.<sup>1</sup> Portanto, o ambiente microbiano materno durante a gestação pode influenciar, notavelmente, o desenvolvimento imunológico do recém-nascido e, consequentemente, a futura saúde da criança. Atualmente, está bem estabelecido que os primeiros eventos de colonização microbiana fornecem ao recém-nascido estímulos vitais para a sua maturação imunológica.<sup>115,122</sup> Assim, se a translocação microbiana materno-fetal de facto ocorrer, o microbioma materno (ex.: oral e intestinal) pode ser alvo de modulação durante a gravidez, com o intuito de otimizar e potenciar a transferência de microrganismos benéficos e suprimir a transferência de bactérias nocivas ou patogénicas para o feto, o que poderá constituir uma oportunidade de tratamento personalizado visando a saúde em idade pediátrica.<sup>123</sup> Embora difícil, a colheita e a análise de múltiplos microbiomas do tecido intrauterino materno e a sua comparação com outros locais do corpo torna-se imprescindível.<sup>124</sup>

Apesar da colonização *in útero*, sob condições gestacionais normais, ser um tema ainda altamente controverso nos dias de hoje, em seguida são referidos alguns indícios da sua provável ocorrência:

- Microbiota do trato reprodutivo antes da gravidez: inúmeras publicações relatam a presença de uma microbiota fisiológica em todas as fases e em todos os locais do corpo relacionados com a reprodução humana, incluindo o trato reprodutivo da mulher (ex.: ovário, trompa de Falópio, útero, colo do útero e cavidade vaginal) e do homem (ex.: testículos, sémen/espermatozóides, próstata e glândulas seminais), bem como as estruturas fetais, como a placenta e o cordão umbilical, permitindo interações complexas com os gametas, os embriões e os fetos na interface dos tecidos maternos.<sup>125</sup>

- Microbioma do endométrio: Verstraelen *et al.* (2016) demonstrou a existência de uma microbiota bacteriana em tecido endometrial de mulheres não grávidas e sem anomalias uterinas, distinta da do aspirado vaginal.<sup>126</sup> Moreno *et al.* (2016) verificou que uma microbiota endometrial “não dominada por *Lactobacillus* spp.” está associada a uma significativa diminuição da taxa de

sucesso de implantação, da ocorrência de gravidez e da sua manutenção, bem como da taxa de mortalidade perinatal.<sup>127</sup> Por outro lado, um estudo experimental em ratinhos evidenciou que bactérias maternas podem ser transferidas para o feto *in útero* através do TGI,<sup>117</sup> embora o mecanismo subjacente a essa translocação permaneça incerto.

▪ Microbiota da placenta: um número crescente de relatos descreve a presença de bactérias, ou de DNA bacteriano, num ambiente placentário saudável,<sup>1,128,129</sup> sem diferenças observadas entre placas basais de gestações pré-termo e de termo.<sup>130</sup> Aagaard *et al.* (2014) sugeriu que a placenta abriga um microbioma específico de baixa abundância, mas metabolicamente rico e composto por comensais não-patogênicos na sua maioria (ex.: *phyla* Firmicutes, Tenericutes, Proteobacteria, Bacteroidetes e Fusobacteria), havendo evidência, ainda que indireta, da sua semelhança com o microbioma oral materno.<sup>116</sup> Adicionalmente, Jimenez *et al.* (2005) isolou espécies bacterianas a partir do sangue do cordão umbilical sem qualquer evidência, clínica ou histológica, de infecção ou inflamação,<sup>131</sup> as quais estão naturalmente presentes no período pós-natal imediato e são consideradas comensais em hospedeiros infantis saudáveis.<sup>1</sup> Além disso, há evidências de que todo o aparelho digestivo materno desempenha um papel fundamental na colonização placentária, por semelhança da composição genômica.<sup>132</sup> Por outro lado, Zheng *et al.* (2015) verificou que a microbiota placentária varia em função do peso ao nascer de recém-nascidos de termo, estando este associado inversamente à abundância relativa de *Lactobacillus* spp. na placenta.<sup>133</sup> De outro ponto de vista, Antony *et al.* (2015) demonstrou que o ganho de peso excessivo na gestação está associado, não apenas a mudanças significativas na microbiota placentária (ex.: diminuição em riqueza de espécies), mas também a alterações nas vias metabólicas codificadas pelo microbioma.<sup>134</sup> Nesta conjuntura, sugere-se que a exposição ao DNA bacteriano via placentária possa contribuir para o desenvolvimento de funções imunológicas *in útero*, particularmente a ativação fisiológica da imunidade inata.<sup>129</sup>

▪ Microbiota do líquido amniótico e do mecônio: são frequentemente detetadas bactérias no líquido amniótico de recém-nascidos saudáveis de termo,<sup>72,116</sup> pressupondo-se que essas possam interagir com o intestino fetal quando o feto engole o líquido que o rodeia.<sup>9</sup> Todavia, a presença bacteriana no líquido amniótico está, por vezes, associada a um estado de doença (ex.: o isolamento de *Mycoplasma* spp. e *Ureaplasma* spp. neste fluido correlaciona-se com situações de corioamnionite, parto pré-termo e ECN no lactente).<sup>72</sup> Por outro lado, inúmeros estudos demonstraram que o mecônio abriga uma comunidade microbiana complexa,<sup>106,135,136</sup> cujas taxa são singularmente distintos dos encontrados em amostras fecais subsequentes.<sup>136</sup> Os microrganismos presentes no mecônio pré-alimentação podem ser considerados como uma representação das comunidades microbianas do TGI fetal antes do parto e, como tal, podem revelar informações importantes sobre a colonização intrauterina e a importância dos organismos intra-

amnióticos no processo de colonização.<sup>8,82,122,135-138</sup> Assim, foi verificado que os taxa bacterianos detetados no mecónio de recém-nascidos saudáveis de termo sobrepõem-se à microbiota intestinal de adultos [Enterobacteriaceae (ex.: *Escherichia coli* and *Shigella* spp.), *Enterococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp. e *Bifidobacterium* spp.], o que sugere uma transferência pré-natal materno-fetal de bactérias gastrointestinais.<sup>117,139</sup> Neste contexto, foi ainda demonstrado que a suplementação materna com probióticos permite a colonização intestinal do recém nascido com a mesma estirpe, embora que transitoriamente.<sup>140</sup> Adicionalmente, há evidência experimental que o conteúdo bacteriano no mecónio possa diferir significativamente, dependendo do estado de saúde materna (ex.: mãe diabética *versus* mãe não diabética).<sup>138</sup> Gosalbes *et al.* (2013) demonstrou que uma microbiota do mecónio dominada por bactérias entéricas ou bactérias ácido-lácticas está, respetivamente, associada a história de dermatite atópica na mãe e a problemas respiratórios no lactente.<sup>8</sup> Avershina *et al.* (2016) verificou que UTO's adquiridas verticalmente, correspondendo a *Bifidobacterium breve* e *Bifidobacterium bifidum*, persistem no intestino do lactente até aos 6 meses e 1 ano de idade, respetivamente, constando ainda que o número de filotipos ou UTO's compartilhados entre mãe e recém-nascido aumenta com a idade do lactente, até aos 2 anos.<sup>85</sup>

#### 2.5.1.1. FATORES MATERNOS

Koren *et al.* (2012) descreveu alterações na microbiota intestinal materna ao longo da gestação, sendo encontrada maior semelhança entre a microbiota intestinal neonatal e a microbiota do intestino materno durante o primeiro trimestre. Este facto sugere que a transferência microbiana materno-fetal poderá ocorrer no início da gravidez, embora mais investigações sejam necessárias para confirmar, ou não, esta ocorrência.<sup>141</sup> De qualquer modo, a gestante pode criar um ciclo ambiental, potencialmente, desfavorável, com uma microbiota intestinal inadequada que será transferida para a descendência, não só durante a gestação, mas também durante o parto.<sup>142</sup>

De forma não surpreendente, condições como o excesso de peso [índice de massa corporal (IMC)  $\geq 25$  e  $< 30$ ]/obesidade pré-gestacional (IMC  $\geq 30$ ), o ganho ponderal e a dieta maternos durante a gestação podem predispor a alterações da microbiota intestinal materna, embora sejam necessários estudos adicionais para avaliar o real impacto no risco de desenvolvimento de doença metabólica na criança.<sup>143</sup> Collado *et al.* (2008) observou que mulheres com obesidade pré-gestacional possuem uma microbiota intestinal significativamente diferente no 1.º e 3.º trimestres de gestação, em comparação com gestantes de peso pré-gestacional normal (IMC  $< 25$ ). Além disso, verificou que um ganho ponderal excessivo durante a gestação e, independentemente do IMC pré-gestacional, está associado a alterações significativas na composição da microbiota intestinal das gestantes. Especificamente, determinaram-se níveis claramente superiores de *Bacteroides* spp. e *Staphylococcus* spp. em mulheres obesas, enquanto que mulheres com ganho ponderal excessivo

apresentavam uma maior abundância de espécies de *Bacteroides* spp.<sup>144</sup> Neste contexto, existem alguns inconsistências entre estudos, as quais podem ser devidas ao facto de as amostras serem colhidas em etapas diferentes da gestação, além de que alguns estudos comparam mulheres de peso normal com mulheres obesas, enquanto que outros efetuam a comparação entre mulheres de peso normal e mulheres com excesso ponderal.<sup>143</sup>

Apesar dos dados disponíveis sugerirem que o IMC materno pré-gestacional e o ganho ponderal gestacional não são os principais determinantes da composição taxonómica geral do intestino do lactente, é possível que tais características possam influenciar microrganismos específicos que, por sua vez, afetem o risco de obesidade posterior. Obviamente que o efeito dessas características pode ser mais pronunciado no neonato por efeitos de programação genética ou naqueles com maior exposição à microbiota intestinal materna (sementeira direta), i.e., aqueles que nascem por via vaginal, que são amamentados e não expostos a antibióticos no início de vida.<sup>145</sup> Collado *et al.* (2010) verificou que, em geral, concentrações fecais significativamente maiores de *Bacteroides* spp. e *Staphylococcus* spp. são identificadas durante os primeiros 6 meses de vida de lactentes cujas progenitoras apresentavam excesso ponderal pré-gestacional, enquanto que níveis superiores de *Bifidobacterium* spp. são encontrados em lactentes de progenitoras com peso normal.<sup>142</sup> Por outro lado, o ganho ponderal excessivo durante a gestação foi associado a uma diminuição dos níveis de *Bacteroides* spp. e *Prevotella* spp. no 1.º mês de vida e a um aumento da abundância de *Clostridium histolyticum* aos 6 meses de idade, em comparação com lactentes cujas progenitoras apresentaram um ganho ponderal dentro do recomendado.<sup>142</sup> Por sua vez, Singh *et al.* (2019) observou que o excesso de peso/obesidade materna pré-gestacional estão associados a alterações na composição do microbioma intestinal do lactente nascido por via vaginal, com maior diversidade e uma abundância relativa de 15 UTO's, incluindo *Bacteroides fragilis*, *Escherichia coli*, *Veillonella dispar* e UTO's dos géneros *Staphylococcus*. e *Enterococcus* spp., as quais estão, normalmente, associadas à disbiose intestinal. Contudo, não foram verificadas associações significativas entre o IMC pré-gestacional e UTO's/diversidade ( $\alpha$ ) do microbioma de lactentes nascidos por cesariana, cujo desenvolvimento difere dos nascidos por via vaginal (explicado adiante). Este último facto é consistente com a hipótese de que o modo de nascimento pode modificar a transferência progenitora-neonato de bactérias associadas à obesidade materna. Para além disso, os dados sugeriram que o IMC pré-gestacional pode ser mais influente no desenvolvimento do microbioma infantil do que o ganho ponderal durante a gestação.<sup>146</sup> Como tal, existe uma clara necessidade de estudos que avaliem o papel destas associações na mediação do ciclo intergeracional da obesidade.<sup>146</sup>

Noutra perspetiva, os hábitos nutricionais durante a gestação parecem influenciar o tipo de microrganismos presentes no mecónio do recém-nascido. Assim, determinou-se que neonatos de

progenitoras com dieta orgânica ou biodinâmica durante a gestação apresentam níveis, ligeiramente, menores de *Escherichia coli*, em comparação com neonatos cujas progenitoras consumiram uma dieta regular.<sup>80,147</sup> Por outro lado, Lundgren *et al.* (2018) demonstrou que o consumo materno de peixe e frutos do mar está, positivamente, relacionado com UTO's do género *Streptococcus* spp. no intestino do lactente. Além disso, o maior consumo de peixe foi associado a *outcomes* do desenvolvimento em idade pediátrica, incluindo diminuição do risco de asma e melhor cognição. Observou-se ainda uma diminuição benéfica de UTO's de *Clostridium neonatale* com o aumento do consumo materno de peixes e frutos do mar, particularmente nos lactentes nascidos por cesariana. Curiosamente, em lactentes nascidos por vaginal verificou-se uma associação negativa entre a abundância de UTO's de *Bifidobacterium* spp., geralmente reconhecido como um género benéfico, e o aumento do consumo materno de frutas, enquanto que nos lactentes nascidos por cesariana observou-se uma associação positiva entre os níveis dessas UTO's e um maior consumo materno de carne vermelha e processada. Adicionalmente, um maior consumo de fruta durante a gestação associou-se a níveis reduzidos de *Bacteroides* spp., com um aumento da abundância dos membros de Clostridiaceae no intestino dos lactentes.<sup>148</sup> Outro estudo constatou que uma dieta materna rica em gordura, independentemente do IMC pré-gestacional, está associada à depleção de *Bacteroides* spp. e ao enriquecimento de *Enterococcus* spp. no mecónio de neonatos, com persistência dos níveis reduzidos de *Bacteroides* até às 6 semanas de idade.<sup>149</sup> Num estudo com ratinhos, Myles *et al.* (2013) verificou que uma dieta ocidental das gestantes resultou numa composição alterada da microbiota intestinal dos descendentes, com um aumento de Clostridiales, apesar do prévio desmame dos lactentes para uma dieta padrão com baixo teor em gordura. Além disso, estes descendentes demonstraram piores *outcomes* nos modelos de infeção, autoimunidade e sensibilização alérgica.<sup>150</sup> Por último, importa ainda destacar que em primatas não humanos, os lactentes cujas progenitoras consumiram uma dieta rica em gordura, quer durante a gestação, quer durante o aleitamento, apresentavam uma significativa disbiose intestinal, a qual não foi totalmente corrigida aquando do desmame para uma dieta padrão com baixo teor em gordura. Tendo em consideração os dados apresentados, torna-se evidente a sua relevância clínica, já que as bactérias colonizadoras primordiais, impulsionadas pela dieta materna, podem apresentar um efeito duradouro na microbiota comensal da descendência, estabelecendo um estadió para o aumento do risco de doenças imunológicas e metabólicas.<sup>143</sup>

### 2.5.2. GENÉTICA DO HOSPEDEIRO

Inúmeras evidências científicas comprovam a influência preponderante da genética do hospedeiro na aquisição e no desenvolvimento da microbiota intestinal em idade pediátrica,<sup>151,152</sup> sendo a sua contribuição avaliada em indivíduos com diferentes graus de parentesco, em particular



gémeos monozigóticos *versus* gémeos dizigóticos. O estudo mais abrangente até ao momento avaliou amostras fecais de 416 pares de gémeos adultos da coorte TwinsUK. No seguimento, foi verificada uma maior semelhança da microbiota intestinal entre pares de gémeos, quando comparada à de indivíduos não aparentados, sendo maior a identidade entre gémeos monozigóticos do que entre gémeos dizigóticos. Contudo, na avaliação da herdabilidade individual dos taxa microbianos, verificou-se que a estrutura da comunidade do *phylum* Bacteroidetes foi moldada, principalmente, por fatores ambientais. Por outro lado, a influência da hereditariedade foi mais significativa para as famílias do *phylum* Firmicutes, incluindo Ruminococcaceae, Lachnospiraceae e Christensenellaceae. Esta última constituiu o táxon de maior heritabilidade, coocorrendo com outros taxa altamente hereditários, como a família Methanobacteriaceae. Estes padrões de coocorrência podem dever-se ao facto de múltiplos taxa serem hereditários e coexistirem, mas cada um ser afetado de forma independente pela genética do hospedeiro, ou, em alternativa, alguns taxa podem ser hereditários e outros estarem correlacionados com a genética do hospedeiro devido à sua coocorrência com os taxa hereditários principais.<sup>41</sup>

Outro estudo elaborado nesta perspetiva avaliou a microbiota intestinal de um triplete dicoriónico saudável (um par de gémeos monozigóticos e um irmão fraterno), tendo observado que, no primeiro mês, o par monozigótico compartilhava uma composição microbiana fecal mais semelhante entre si, mas distinta do irmão fraterno. No entanto, aos 12 meses de idade, o perfil microbiano tornou-se mais uniforme entre os três lactentes, sugerindo que a genética do hospedeiro desempenha um papel mais significativo na composição da microbiota intestinal durante o início de vida, enquanto que os determinantes ambientais dominam posteriormente.<sup>153</sup>

Noutra perspetiva, alguns estudos usam a abordagem de genes candidatos para analisar o envolvimento de genes individuais na composição microbiana intestinal. Entre eles, os indivíduos que possuem um gene funcional fucosiltransferase 2 (FUT2), nomeados como secretores, exibem diferentes comunidades microbianas em comparação com indivíduos não-secretores.<sup>154</sup> O *status* secretor regula a existência de antígenos dos grupos sanguíneos ABO e Lewis na mucosa intestinal, além da glicosilação do muco intestinal e dos HMO. Adicionalmente, a FUT3 produz os antígenos de Lewis A em indivíduos não-secretores e antígenos B em indivíduos secretores. Os perfis de HMO diferem de acordo com o *status* secretor materno, assim como o antígeno do grupo sanguíneo Lewis, devido a variações genéticas do FUT2 e FUT3, respectivamente.<sup>155</sup> Inúmeros outros genes candidatos foram sugeridos como influenciadores da composição microbiana intestinal, em particular, genes que codificam mediadores imunológicos, como o domínio de oligomerização de ligação de nucleotídeos (NOD)-2 e o gene da Febre Mediterrânica Familiar (MEFV).<sup>156</sup> O recetor de NOD2 reconhece fragmentos de dipéptido de muramilo derivados de parede celular bacteriana e regula a libertação de  $\alpha$ -defensinas por células de Paneth. Em humanos, as mutações NOD2 são um

fator de risco para o desenvolvimento de DII e estão associadas à disbiose intestinal.<sup>157</sup> Por outro lado, mutações no gene humano MEFV resultam em Febre Mediterrânea Familiar, uma doença autoimune causada pela liberação desequilibrada de interleucina (IL)-21, com alterações na microbiota intestinal, incluindo menor diversidade bacteriana.<sup>158</sup>

### **2.5.3. VIA DE NASCIMENTO**

*Não foi possível, até ao momento, adicionar o conteúdo referente. Introdução posterior.*

### **2.5.4. IDADE GESTACIONAL**

*Não foi possível, até ao momento, adicionar o conteúdo referente. Introdução posterior.*

### **2.5.5. MODO DE ALIMENTAÇÃO**

*Não foi possível, até ao momento, adicionar o conteúdo referente. Introdução posterior, com inserção no texto da Figura 15 e das Tabelas V e VI.*

### **2.5.6. EXPOSIÇÃO A ANTIBIÓTICOS**

Em primeiro lugar, a extensão do impacto da exposição a antimicrobianos em idade pediátrica depende do espectro, da dose e da duração do tratamento, bem como da via de administração e do próprio indivíduo,<sup>159</sup> o que dificulta uma clara compreensão das suas potenciais consequências no padrão de colonização intestinal do lactente.<sup>160</sup> Inicialmente, a administração de antibióticos é mais prevalente em neonatos pré-termo<sup>161</sup> e/ou nascidos por cesariana.<sup>80</sup> Vários estudos comprovam uma associação entre a exposição a antibióticos durante o período perinatal e o aumento do risco de desenvolvimento de doenças em idade pediátrica como, por exemplo, obesidade,<sup>162</sup> asma,<sup>163</sup> DII<sup>164</sup> e outras condições alérgicas/inflamatórias.<sup>165</sup>

Entretanto, foi colocada a hipótese de que a exposição a antibióticos durante os períodos pré-natal, perinatal e pós-natal pode influenciar o processo de colonização do intestino neonatal e causar um atraso de 6 a 12 meses na maturação microbiana,<sup>95</sup> podendo afetar, consequentemente, o desenvolvimento imunológico precoce, com risco vitalício para doenças imunomediadas.<sup>166</sup> A profilaxia antibiótica intraparto (PAI) é realizada em partos por cesariana ou partos vaginais de progenitoras positivas para o *Streptococcus*  $\beta$ -hemolítico do grupo B (SGB),<sup>167</sup> sendo aplicada nestes últimos casos para reduzir o risco de infeções neonatais precoces, como pneumonia, septicemia e meningite.<sup>168</sup> Neste contexto, é importante salientar que os antibióticos utilizados contra o SGB são diferentes dos administrados para prevenir a infeção materna associada à intervenção cirúrgica na cesariana.<sup>169</sup> Aloisio *et al.* (2014) verificou uma contagem, significativamente, reduzida de *Bifidobacterium* spp. no intestino de neonatos com 7 dias de idade, nascidos por via vaginal e

expostos à PAI, em comparação com lactentes cujas progenitoras não receberam PAI.<sup>170</sup> Num estudo de coorte prospectivo, Azad *et al.* (2016) demonstrou que a PAI, aplicada tanto no parto vaginal como no parto por cesariana, está associada a disbiose da microbiota intestinal do lactente. O impacto foi, particularmente, evidente na PAI aplicada em cesarianas de emergência, ocorrendo diminuição da riqueza e da diversidade microbianas intestinais, com alterações na sua composição (incremento de Firmicutes – *Enterococcus* spp. e *Clostridium* spp.; e depleção de Bacteroidetes – *Bacteroides* spp. e *Parabacteroides* spp) observadas aos 3 meses, as quais persistiram até aos 12 meses de idade, sobretudo em lactentes sem aleitamento materno.<sup>171</sup> De modo semelhante, Coker *et al.* (2019) também verificou que as alterações na composição das comunidades e na abundância diferencial de microrganismos específicos, induzidas pela PAI, podem persistir até, pelo menos, 1 ano de idade.<sup>166</sup> Jakobsson *et al.* (2014) constatou que o efeito sobre a diversidade  $\beta$  da microbiota intestinal dos lactentes foi mais significativo na associação da PAI com cesariana do que na PAI isolada.<sup>89</sup> Por outro lado, Stearns *et al.* (2017) observou que a exposição de lactentes à PAI durante o parto vaginal afeta aspetos da ecologia microbiana intestinal que, embora dramática nos primeiros momentos, desaparece por volta das 12 semanas de vida.<sup>169</sup> Adicionalmente, analisou que os lactentes nascidos por via vaginal e expostos à PAI apresentavam uma diversidade  $\alpha$  da microbiota fecal significativamente menor, em comparação com lactentes nascidos por via vaginal e não expostos à PAI,<sup>169</sup> o que foi corroborado em outros 2 estudos de coorte de nascimento.<sup>172,173</sup> Em paralelo, determinou-se que as alterações são limitadas às famílias Bacteroidaceae e Enterobacteriaceae, e ao género *Clostridium* spp. quando há exposição à PAI durante o parto vaginal, sendo a disbiose intestinal mais extensa na PAI associada ao parto por cesariana, ocorrendo ao nível de *phylum* (Bacteroidetes, Firmicutes e Proteobacteria) e afetando vários géneros, como verificado em Azad *et al.* (2016).<sup>89</sup> Considerando o que foi referido, as associações encontradas para a PAI foram independentes do "efeito de cesariana", uma vez que as alterações também foram observadas após a PAI com parto vaginal.<sup>169,171</sup> Curiosamente, está descrita uma diversidade microbiana significativamente elevada no intestino de neonatos nascidos por cesariana de emergência,<sup>174</sup> podendo essa dever-se a uma hospitalização mais prolongada.<sup>80</sup> Ainda no contexto do parto por cesariana, considera-se que o tratamento antibiótico materno no pós-parto e a subsequente transferência para o leite materno podem contribuir para perturbações mais significativas na microbiota intestinal destes lactentes. De facto, foram encontrados níveis diminuídos de *Bifidobacterium* spp. e de *Lactobacillus* spp. no leite materno e aumento da colonização intestinal do neonato com *Clostridium difficile* e *Enterococcus* spp. durante a antibioterapia materna pós-natal.<sup>174</sup> Por outro lado, constatou-se que uma maior duração da exposição à PAI aumenta a magnitude do efeito nas populações de *Bifidobacterium* spp., sugerindo um atraso ainda mais significativo na maturação da microbiota intestinal. Dados encontrados

indicam que os lactentes com exposições mais prolongadas experimentam um impacto disbiótico mais persistente.<sup>169</sup> Noutra perspetiva, evidências sugerem que o aleitamento materno apresenta um potencial para restaurar as alterações na microbiota intestinal induzidas pela PAI. Portanto, em lactentes nascidos por cesariana de emergência com PAI e sem aleitamento materno exclusivo por, pelo menos, 3 meses, verificou-se uma depleção persistente de Bacteroidaceae e um incremento na abundância de Clostridiales aos 12 meses de idade, o que não foi observado nos lactentes amamentados. Adicionalmente, o aleitamento materno precoce promoveu uma maior diversidade na microbiota intestinal aos 12 meses, sendo o efeito dose-dependente, de acordo com a duração e a exclusividade da amamentação, mas independente da vida de nascimento.<sup>174</sup> Outro estudo demonstrou que o aleitamento materno contínuo após cesariana de emergência promove um perfil de microbiota intestinal no pós-desmame comparável aos lactentes nascidos por parto vaginal sem exposição à PAI.<sup>171</sup> Todavia, é importante destacar, como referido previamente, que a composição da microbiota do leite materno é modificada de acordo com o tipo de parto, pelo que podem ocorrer variações nos seus efeitos em lactentes expostos à PAI.<sup>175</sup>

Tendo em conta o referido, denota-se que o impacto sobre certas contagens bacterianas em amostras fecais de recém-nascidos é devido ao efeito combinado da exposição à PAI, do modo de nascimento<sup>171</sup> e do modo de alimentação pós-parto.<sup>173,176</sup>

No que respeita à antibioterapia em neonatos e lactentes, essa está também associada a distúrbios nos padrões esperados de colonização precoce, registando-se uma diminuição da diversidade microbiana intestinal, com níveis aumentados de Proteobacteria e prejuízo de comunidades potencialmente benéficas, incluindo membros de Actinobacteria,<sup>100</sup> *Bacteroides* spp. e *Lactobacillus* spp.<sup>177</sup> Neste contexto, Fouhy *et al.* (2012) mostrou que neonatos expostos a ampicilina e a gentamicina, durante curtos períodos de tempo após o nascimento, tendem a apresentar proporções maiores de Proteobacteria e, em contrapartida, contagens muito baixas de Actinobacteria e *Lactobacillus* spp., perdurando essas alterações até 4 semanas após o término do tratamento.<sup>177</sup> Sob outra perspetiva, estudos em modelos animais registaram uma ativação de células Th-17 no cólon após antibioterapia,<sup>178</sup> com impacto local negativo sobre a diversidade, a motilidade e a expressão de recetores do tipo Toll (TLR).<sup>179</sup> Adicionalmente, estudos em ratinhos demonstraram que a exposição precoce a antibióticos pode aumentar a suscetibilidade para asma,<sup>104</sup> estimulando o aumento de AGCC (ácidos gordos de cadeia curta) e a adiposidade por alteração da regulação do metabolismo lipídico.<sup>180</sup> Além disso, um estudo em humanos, associado à terapêutica com vancomicina, observou um aumento do metabolismo da glucose e dos ácidos biliares, com desenvolvimento de adiposidade.<sup>181</sup> Portanto, existem evidências que a antibioterapia em idade pediátrica pode aumentar o ganho ponderal subsequente, ampliando o risco de excesso de peso/obesidade na infância e, posteriormente, na idade adulta.<sup>182,183</sup> Complementarmente,

dados revelam um papel preponderante da antibioterapia no aumento do risco de desenvolvimento de outras doenças em idade pediátrica, em particular se administrada numa fase muito precoce e/ou por longos períodos de tempo, incluindo asma e outras doenças atópicas,<sup>184,185</sup> diabetes *mellitus* tipo I,<sup>186</sup> DII<sup>187</sup> e até mesmo, distúrbios neurocognitivos.<sup>188</sup> Contudo, são necessárias investigações adicionais para compreender claramente o mecanismo pelo qual a disbiose intestinal, induzida por antibióticos, influencia o desenvolvimento imunológico na fase inicial da vida.<sup>72</sup> Noutra instância, a combinação do distúrbio ecológico com a biodiversidade intestinal diminuída pode promover oportunidades para agentes patogénicos entéricos, sendo a infeção por *Clostridium difficile* uma das infeções mais comuns associadas à perturbação intestinal por antibióticos na idade pediátrica.<sup>189</sup> Um outro aspeto importante a considerar, é o facto de que a exposição a antibióticos pode modificar a homeostasia entre os componentes da microbiota bacteriana, fúngica e viral.<sup>190</sup> Assim, e a título de exemplo, os antibióticos podem causar o crescimento excessivo de espécies fúngicas, particularmente *Candida albicans*, com a indução de mastócitos e expressão inflamatória de interleucinas, como IL-5 ou IL-13.<sup>191</sup>

Por último e, não menos importante, destaca-se o facto de que a prescrição excessiva de antibioterapia em idade pediátrica constitui o principal fator impulsionante do desenvolvimento e da disseminação da resistência antimicrobiana – desenvolvimento longitudinal do resistoma (conjunto de genes associados à resistência bacteriana aos antimicrobianos, presentes num determinado ambiente).<sup>156</sup> Neste contexto, Wintersdorff *et al.* (2016) evidenciou que os genes de resistência a antibióticos flutuam de acordo e, pelo menos parcialmente, como consequência, da flutuação da microbiota intestinal durante os primeiros meses de vida, o que indiciar a forma como o resistoma do intestino humano é moldado numa idade tão precoce pela composição da microbiota intestinal.<sup>192</sup> É fundamental ainda destacar que a colonização com bactérias resistentes representa um risco para infeções subsequentes por essas bactérias<sup>193</sup> e, além disso, os genes de resistência estão, frequentemente, localizados em elementos genéticos móveis, pelo que a sua potencial disseminação entre várias espécies na microbiota humana tem vindo a ser descrita na literatura.<sup>194</sup>

Em resumo, a antibioterapia deve ser usada criteriosamente ao longo da vida, especialmente durante os primeiros 1000 dias. Contudo, nos casos em que o tratamento antibiótico é imprescindível, o médico deve considerar suplementos probióticos, já que evidências iniciais sugerem uma possível diminuição do impacto deletério da antibioterapia sobre o microbioma intestinal em idade pediátrica.<sup>2</sup>

#### 2.5.7. EXPOSIÇÃO A PREBIÓTICOS E PROBIÓTICOS

*Não foi possível, até ao momento, adicionar o conteúdo referente. Introdução posterior.*

## 2.5.8. MEIO AMBIENTE ENVOLVENTE

O agregado familiar e parentes próximos têm sido descritos como um fator ambiental relevante que pode influenciar o padrão de colonização da microbiota intestinal em idade pediátrica.<sup>195</sup> Assim, lactentes primogénitos parecem apresentar um padrão de colonização distinto, em comparação com lactentes que crescem junto de irmãos mais velhos, embora os dados sejam escassos e nem sempre consistentes, sendo necessários mais estudos para avaliar o real impacto do tamanho e estrutura familiares, bem como da ordem de nascimento dos irmãos.<sup>1</sup> Num estudo de coorte de nascimento, constatou-se que lactentes de 1 mês de idade com irmãos mais velhos apresentavam uma maior proporção de *Bifidobacterium* spp. na sua microbiota intestinal, em comparação com lactentes da mesma idade, mas filhos únicos.<sup>80</sup> Por outro lado, um estudo envolvendo três coortes de nascimento na Europa demonstrou maiores proporções de Enterobacteriaceae não-*Escherichia coli* e de *Clostridium* spp. na colonização intestinal inicial de lactentes sem irmãos, observando-se um rácio menor anaeróbio estrito/anaeróbio facultativo aos 12 meses de idade.<sup>196</sup> Em geral, verifica-se que a presença de irmãos mais velhos está associada a um aumento da diversidade e da riqueza da microbiota intestinal em idade pediátrica, corroborando potencialmente a “hipótese da higiene”,<sup>197</sup> a qual destaca a necessidade de uma exposição microbiana suficiente para a programação adequada do sistema imunológico.<sup>198</sup> Nesta perspetiva, analisou-se que a atopia, incluindo a dermatite atópica, está associada a disbiose intestinal, com uma correlação negativa em relação ao número de irmãos.<sup>115</sup> Por isso, dados existentes sugerem que os lactentes primogénitos abrigam uma microbiota menos madura em relação à de lactentes da mesma idade com irmãos mais velhos, o que pode potenciar o risco de doença alérgica.<sup>199</sup> Não obstante, estes dados podem dever-se à transferência bacteriana direta ou indireta entre irmãos ou a outros fatores como, por exemplo, a alteração da microbiota vaginal materna e/ou da composição do leite materno em múltiparas, em comparação com mulheres primíparas, havendo a necessidade de estudos adicionais.<sup>156</sup>

Noutra perspetiva, Azad *et al.* (2013) observou que a presença de animais de estimação pode afetar a colonização infantil,<sup>112</sup> verificando-se um efeito benéfico desse contacto na prevenção de algumas alergias e outras doenças imunológicas, embora os mecanismos moleculares e a influência potencial sejam desconhecidos.<sup>197</sup> Adicionalmente, determinou-se que a convivência de lactentes com animais domésticos potencia níveis aumentados de bactérias da família Peptostreptococcaceae, particularmente *Clostridium difficile*, e uma abundância diminuída de *Bifidobacterium* spp. aos 4 meses de idade.<sup>156</sup> Todavia, outros estudos não encontraram relação entre a presença de animais domésticos e a microbiota intestinal humana.<sup>80,200</sup>

No contexto ambiental, é importante ainda considerar a potencial influência do ambiente hospitalar onde ocorre o nascimento e da manipulação do recém-nascido no desenvolvimento da

microbiota intestinal, sendo necessário compreender os mecanismos de transmissão, as populações microbianas dominantes nesse ambiente e as estirpes com maior probabilidade de colonização.<sup>201</sup> Além disso, não só importa a exposição ambiental pós-natal, mas também a exposição materna a diferentes ambientes, a qual pode influenciar o risco do desenvolvimento de manifestações alérgicas na descendência.<sup>190</sup>

No que concerne à localização geográfica, as diferenças encontradas na microbiota intestinal parecem estar relacionadas a padrões alimentares e estilos de vida específicos de determinada região.<sup>195</sup> A título de exemplo, amostras fecais de crianças residentes num bairro pobre no Bangladesh apresentavam uma composição e estrutura bacterianas, significativamente, diferentes das analisadas em crianças da mesma faixa etária, mas residentes numa comunidade suburbana da classe média alta nos EUA. Assim, observou-se uma microbiota intestinal enriquecida em *Prevotella* spp. e escassa em *Bacteroides* spp. no grupo de crianças pertencente ao país em desenvolvimento.<sup>202</sup> Outro estudo, comparando lactentes do norte da Europa com lactentes do sudeste africano, revelou uma maior abundância de *Bifidobacterium* spp. e do grupo *Bacteroides-Prevotella* spp. nos últimos lactentes.<sup>203</sup> Neste contexto, crianças que vivem em zonas rurais possuem uma maior diversidade e riqueza nas comunidades bacterianas intestinais, apresentando menor risco de desenvolvimento de alergias, em comparação com crianças residentes em meio urbano.<sup>112,204</sup> De Filippo *et al.* (2010) verificou esta tendência, destacando uma maior proporção de bactérias produtoras de AGCC nas crianças do meio rural, cujo papel protetor contra a inflamação intestinal foi comprovado. Adicionalmente, correlacionou a coevolução deste padrão microbiano com uma dieta rica em hidratos de carbono, sem proteína ou gordura animal, *versus* uma dieta ocidental padrão, com alimentos processados, nas crianças do meio urbano. Aqui, importa destacar que a variação geográfica no estabelecimento de padrões de colonização pode resultar, principalmente, de diferenças na dieta, já que a segregação da composição microbiana em distintos *clusters* geográficos torna-se aparente apenas após o desmame, ou seja, com o início do consumo de alimentos sólidos.<sup>205</sup> Além disso, as melhores condições sanitárias dos países ocidentais, em comparação com as infraestruturas pouco desenvolvidas e os ambientes populosos dos países em desenvolvimento, poderão ter um impacto significativo nas diferenças de estrutura encontradas nas comunidades microbianas comensais.<sup>156</sup>

## **2.6. PAPEL DA MICROBIOTA INTESTINAL *EARLY-LIFE* NA PROGRAMAÇÃO DA SAÚDE FUTURA**

A microbiota intestinal desempenha um papel fundamental na manutenção da saúde do hospedeiro em idade pediátrica, programando a saúde do futuro adulto, pelo que exerce funções metabólicas, protetoras e estruturais (*Figura 16*). Portanto, os microrganismos comensais do intestino, com a sua ampla diversidade genética e metabólica, influenciam a fisiologia e o

desenvolvimento do sistema imunológico do hospedeiro<sup>22</sup> (Figuras 17 e 18). Estudos *in vivo*, comparando modelos animais ditos convencionais (microbiota desenvolvida em condições normais) com animais *germ-free*, demonstraram claramente os efeitos deletérios para a saúde da ausência de qualquer interação microbiota-hospedeiro.<sup>206</sup> Curiosamente, é necessário recolonização intestinal no início da vida para restaurar os fenótipos imunológicos alterados nos modelos *germ-free*, os quais não são revertidos totalmente para a normalidade quando a recolonização é apenas facilitada em idade adulta.<sup>207</sup>

### 2.6.1. DESENVOLVIMENTO DO SISTEMA IMUNOLÓGICO

A microbiota intestinal desempenha um papel fundamental no desenvolvimento do sistema imunológico do hospedeiro, o qual, por sua vez, regula a estrutura e a função da microbiota intestinal.<sup>208</sup> Ratinhos *germ-free* apresentam comprometimento no desenvolvimento imunológico, caracterizado por uma arquitetura imatura e desorganizada dos gânglios linfáticos mesentéricos e das placas de Peyer, com folículos linfóides isolados subdesenvolvidos<sup>209</sup> e diminuição do número de linfócitos e células dendríticas intestinais, bem como dos níveis de peptídeos antimicrobianos<sup>210</sup> e da imunoglobulina secretora A (sIgA).<sup>211</sup> Neste contexto, importa destacar que a maturação do sistema imunológico do hospedeiro depende da sua microbiota específica, tendo sido observado um subdesenvolvimento imunológico em ratinhos *germ-free* colonizados com microbiota humana.<sup>208</sup> Os défices imunológicos podem ser corrigidos por colonização com diversas bactérias comensais, mas num processo dependente da idade, sugerindo que tanto a composição quanto o momento da colonização são críticos para a educação do sistema imunológico.<sup>212</sup>

Dois elementos da arquitetura imunológica gastrointestinal potencialmente afetados pela exposição microbiana e pelo desenvolvimento da microbiota intestinal no início da vida são a camada de muco (como explicado adiante) e o tecido linfóide associado ao intestino (GALT), o qual inclui as placas de Peyer.<sup>213</sup> A sIgA é um dos principais fatores no desenvolvimento do sistema imunológico e é também parte integrante do GALT. Este sistema constitui uma importante defesa contra microrganismos e antígenos ambientais, dada a exposição excessiva a compostos desconhecidos no TGI, além de que a superfície da mucosa intestinal é a principal porta de entrada no corpo humano. Os complexos de sIgA aglutinam microrganismos e previnem a aderência de bactérias e vírus patogénicos à superfície da mucosa.<sup>160</sup> Além disso, a sIgA tem a capacidade de excretar para o lúmen intestinal, os microrganismos e antígenos que cruzaram a barreira epitelial da lâmina própria.<sup>160</sup>

Como referido previamente, inúmeros estudos fornecem evidências crescentes de uma provável exposição microbiana *in útero*, a qual poderá desempenhar um papel importante na programação do desenvolvimento imunológico pós-natal ainda durante a vida fetal, bem como na



maturação simultânea do TGI e do metabolismo associado.<sup>117,129,131</sup> Neste contexto, é importante destacar o facto de que metabolitos da microbiota intestinal materna podem atravessar a barreira placentária e exercer um efeito direto sobre o sistema imunológico fetal.<sup>214</sup> Assim, é importante entender a atividade metabólica da microbiota intestinal do feto, de modo a compreender o seu papel na imunoprogramação fetal.<sup>215</sup> Blumer *et al.* (2007) verificou que a suplementação probiótica durante a gestação com *Lactobacillus rhamnosus* GG resulta na diminuição da inflamação e do risco de alergia na descendência.<sup>216</sup> Tanto o sistema imunológico inato quanto o adaptativo não são totalmente funcionais ao nascimento, embora as principais células efetoras estejam presentes,<sup>129</sup> o que pode ser explicado pela baixa exposição antigénica no período pré-natal e pela necessidade de evitar incompatibilidade com o sistema imunológico da progenitora.<sup>217</sup> A colonização intestinal no período pós-parto é considerada a inoculação mais massiva do sistema imunológico em idade pediátrica, pelo intenso estímulo antigénico, o qual é necessário para a adequada maturação do intestino e de órgãos distais, afetando o hospedeiro a um nível sistémico.<sup>1</sup> Os sistemas imunológicos inato e adaptativo amadurecem durante os primeiros 2 a 3 anos de vida,<sup>218</sup> regulando o crescimento da microbiota.<sup>217</sup> No que diz respeito à imunidade inata, as células epiteliais e imunológicas do intestino devem, por um lado, prevenir o crescimento excessivo e resistir à translocação de patógenos ou antígenos nocivos para o tecido subepitelial, evitando a expressão de doença, mas, por outro lado, devem tolerar a microbiota luminal, não desenvolvendo respostas exageradas a antígenos inócuos ou bactérias comensais, de forma a não induzir um estado inflamatório crónico da mucosa intestinal e, consequentemente, uma DII.<sup>9</sup> Neste contexto, ocorre uma colonização dita “permissiva” no período perinatal, em que o sistema imunológico passa de um estado de propensão à hiperestimulação para um estado de tolerância.<sup>219</sup> Recentemente, foi demonstrado um mecanismo pelo qual o intestino neonatal permite a colonização microbiana: existência de uma população específica de células eritroides CD71 + neonatais que amortece a resposta imunológica inata.<sup>220</sup> As bactérias colonizadoras estimulam a reação dos enterócitos e das células linfóides contra agentes patogénicos que tentam cruzar a barreira, evocando uma resposta inflamatória (IL-6 ou IL-8). Esta sinalização do sistema imunológico inato é mediada por recetores de reconhecimento de padrões (PRR), tais como TLR e recetores de NOD 1 e 2 expressos nessas células, os quais reconhecem e ligam-se a macromoléculas microbianas específicas – os padrões moleculares associados ao patógeno [ex.: lipopolissacarídeo (LPS), flagelina, peptidoglicano, CpG DNA e peptídeos N-formil]. As ações do hospedeiro dirigidas a bactérias, componentes e metabolitos bacterianos é considerada específica para espécie/estirpe.<sup>159</sup> O TLR-2 é responsivo ao peptidoglicano de Gram-positivos, enquanto que o TLR-4 é especializado na monitoração do LPS dos membros Gram-negativos, o qual constitui um precursor para as respostas inflamatórias do hospedeiro.<sup>221</sup> A ativação dos PRR inicia as vias de sinalização do NF-κB e da proteína quinase

ativada por mitógenos, vem como cascatas de sinalização dependentes de caspases, com a liberação de peptídeos protetores, citocinas, quimiocinas e fagócitos. Estes processos podem resultar numa resposta protetora às bactérias comensais, numa resposta inflamatória a organismos patogênicos ou constituírem um gatilho para a apoptose.<sup>22</sup> No contexto, evidências relatam propriedades anti-inflamatórias em *Bifidobacterium* spp. e *Bacteroides* spp., tipicamente os microrganismos mais abundantes na microbiota do lactente, os quais possuem uma riqueza em ligandos TLR-9, cuja estimulação aumenta a integridade epitelial e dirige a maturação celular e física do sistema imunológico em desenvolvimento.<sup>222</sup>

No que concerne à imunidade adaptativa, esta requer uma resposta balanceada de células T *helper* (ou T auxiliares; Th), as quais medeiam a imunidade humoral, celular e tolerogénica. Recém-nascidos a termo apresentam um viés de células Th-2, permitindo protegê-los da rejeição uterina<sup>223</sup> (Figura 19), já que durante a gestação, o sistema imunológico materno é enviesado para uma imunidade do tipo Th-2 e esse ambiente influencia o sistema imunológico fetal a deslocar-se também nessa direção.<sup>213</sup> Durante as primeiras semanas e meses de vida, com a colonização intestinal inicial, este viés modifica para uma resposta balanceada entre células Th-1, Th-2, Th-17 e T reguladoras (Tregs). Em animais *germ-free*, o viés Th-2 é mantido, sendo mandatária a colonização intestinal no período neonatal, e não mais tarde, antes que uma resposta balanceada de células T se possa desenvolver no neonato.<sup>224</sup> Neonatos nascidos por cesariana apresentam uma ativação tardia da imunidade do tipo Th-1, devido à sua colonização alterada, como explicado anteriormente.<sup>89</sup> A persistência de uma imunidade predominante do tipo Th-2 está associada a doenças alérgicas, incluindo asma em idade pediátrica.<sup>213</sup> Portanto, os microrganismos intestinais modelam o repertório de células T,<sup>208</sup> determinando a proporção de células Th-1 e Th-2.<sup>225</sup> Há evidências de que oligodesoxinucleótidos CpG (não metilados), presentes no DNA bacteriano, exercem efeitos imunoestimuladores através da ativação do TLR-9, com subsequente resposta imunológica do tipo Th-1.<sup>226</sup> As Tregs são células que desempenham um papel importante na regulação ou supressão de outras células do sistema imunológico.<sup>227</sup> O desenvolvimento/indução de células efectoras Th-17, as quais produzem IL-17A, IL-17F, IL-21 e IL-22,<sup>227</sup> é também modulado pela microbiota, pelo que a sua abundância na mucosa intestinal é significativamente reduzida em ratinhos *germ-free* ou expostos a antibióticos.<sup>228</sup>

Complementarmente, a chamada “Hipótese da higiene” corrobora o papel da microbiota intestinal na maturação do sistema imunológico, em que modificações no padrão de exposição microbiana representam um fator crítico. A composição da microbiota intestinal e a exposição a patógenos alimentares e orofecais constituem, provavelmente, importantes influências homeostáticas, já que induzem a expressão de sIgA na barreira de superfície intestinal e promovem tolerância oral por alteração da atividade das células Th-2.<sup>160</sup> A tolerância ocorre quando exposições

repetidas aos antígenos orais estimulam a libertação de citocinas pelas células Treg da mucosa, como a IL-10 e o fator de crescimento transformador (TGF)- $\beta$ , regulando negativamente as respostas imunológicas humorais e celulares.<sup>105</sup> Além disso, foi demonstrado que o polissacarídeo A (PSA), na superfície de *Bacteroides fragilis*, interage com recetores TLR-2 nas células dendríticas e promove tolerância imunológica por indução das células Treg,<sup>225</sup> causando supressão de uma resposta mediada por IL-17.<sup>229</sup> Por outro lado, a exposição de animais *germ-free* ao PSA pode alterar um viés de resposta Th-2 para uma resposta balanceada Th-1 e Th-2.<sup>225</sup> Também a colonização por *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* está articulada com o desenvolvimento normal da tolerância imunológica, mostrando ser capaz de normalizar a permeabilidade da mucosa intestinal.<sup>230</sup> Animais *germ-free* não podem desenvolver tolerância, a não ser que a colonização intestinal ocorra no período pós-natal.<sup>118</sup>

Um outro aspeto a destacar centra-se no facto de que não só as bactérias colonizadoras influenciam o desenvolvimento imunológico intestinal, mas os seus metabolitos e produtos segregados também interagem, *per si*, com o intestino e exercem efeitos imunomodulatórios potentes. A título de exemplo, níveis elevados de acetato, butirato e ácido propiónico podem estimular a diferenciação e proliferação de células Treg FOXP3 através de um recetor expresso nessas – o GFR43, ativando propriedades imunossupressoras por libertação de IL-10.<sup>9</sup> Assim, a análise de amostras fecais de doentes com DII mostrou uma menor proporção de estirpes bacterianas produtoras de AGCC em *clusters* de *Clostridium* XIVa e IV, comparando com indivíduos saudáveis.<sup>231</sup>

Em suma, um padrão de colonização normal e balanceado, durante o período neonatal, é fundamental para desenvolver tolerância imunológica e prevenir a predisposição para doenças alérgicas e outras doenças imunomediadas mais tarde na vida, as quais representam o novo paradigma de doença nos países desenvolvidos.<sup>105</sup>

## 2.6.2. FUNÇÕES METABÓLICAS ESSENCIAIS

A microbiota intestinal desempenha um papel preponderante na digestão e no metabolismo da dieta em idade pediátrica – colostro, leite materno/leite de fórmula e alimentação durante e após o desmame, além da ampla variedade de alimentos na idade adulta. Por outro lado, a microbiota atua na decomposição de toxinas e drogas, promove a absorção de iões,<sup>2</sup> sintetiza vitaminas (ex.: vitaminas K-2 e B hidrossolúveis por *Bifidobacterium* spp.)<sup>232</sup> e aminoácidos essenciais para a saúde neonatal, participando na biotransformação intestinal dos ácidos biliares, com implicação no metabolismo do colesterol e da glicose.<sup>22</sup> Estirpes de *Bifidobacterium* spp., *Lactobacillus* spp., *Propionibacterium* spp., *Enterococcus* spp. e de *Lactococcus* spp. produzem ácido linoleico conjugado, sendo esse importante para o crescimento e desenvolvimento adequados do

recém-nascido. Por outro lado, e como explicado posteriormente, algumas bactérias intestinais produzem metabolitos neuroativos, o que torna possível um mecanismo de ação pelo qual a microbiota poderá exercer efeitos sobre o desenvolvimento e função cerebrais.<sup>232</sup> Adicionalmente, as bactérias intestinais participam na produção de muco endógeno que reveste o epitélio intestinal<sup>22</sup> e produzem AGCC (acetato, propionato e butirato) por fermentação de amido resistente e hidratos de carbono não digeríveis (fibra alimentar),<sup>233</sup> os quais fornecem energia e mantêm o crescimento e o desenvolvimento do TGI neonatal. Dos *phyla* bacterianos predominantes: a) Bacteroidetes – bactérias Gram-negativas, anaeróbicas, não formadoras de esporos, mas enriquecidas com enzimas para degradar hidratos de carbono; b) Firmicutes (ex.: *Lactobacillus* spp., *Faecalibacterium* sp. e *Ruminococcus* spp.) – bactérias Gram-positivas, anaeróbicas e formadoras de esporos, as quais fermentam açúcares simples para produzir uma variedade de AGCC.<sup>232</sup> A fermentação bacteriana ocorre no cego e no cólon, onde os AGCC são absorvidos, estimulando a absorção de sais e água e apresentando um efeito trófico sobre o epitélio intestinal.<sup>234</sup> O butirato é uma fonte de energia primária para as células epiteliais do cólon e é quase totalmente consumido aí, enquanto que o acetato é o substrato primário para a síntese de colesterol<sup>22</sup> e juntamente com o propionato, tornam-se disponíveis a nível sistémico.<sup>208</sup> Localmente, os AGCC acidificam o lúmen do cólon e limitam o crescimento de potenciais patógenos.<sup>232</sup> Como referido na secção anterior, estes metabolitos também regulam, pelo menos em parte, os efeitos imunomoduladores da microbiota intestinal,<sup>235-237</sup> interagindo com recetores acoplados à proteína G, os quais estão presentes nas células imunológicas e epiteliais do intestino,<sup>214</sup> pelo que perfis alterados de AGCC fecais são encontrados na doença alérgica.<sup>215</sup> Além disso, os níveis de AGCC estão significativamente diminuídos na DII.<sup>238</sup> Noutra instância, estes metabolitos são reconhecidos por recetores expressos em células endócrinas intestinais que medeiam a secreção de hormonas envolvidas no controlo do apetite, estando implicados na ingestão alimentar.<sup>232</sup> No seguimento, estes podem ainda estimular a produção de leptina pelos adipócitos, influenciando o comportamento alimentar.<sup>232</sup> Relatórios recentes mostraram que o propionato ativa a gliconeogénese intestinal através do eixo intestino-cérebro.<sup>239</sup> Noutro contexto, o propionato demonstrou afetar células dendríticas e macrófagos na medula óssea, bem como células Th-2 nas vias aéreas.<sup>240</sup>

Muitos dos metabolitos microbianos, que podem atuar como autócrinos ou parácrinos, são essenciais para a saúde e desempenham um papel importante na regulação do crescimento normal na idade pediátrica. Esses metabolitos são amplamente determinados pela composição da dieta e pelo padrão de ingestão de alimentos.<sup>232</sup> Estudos em humanos e em modelos animais evidenciaram um papel da microbiota intestinal e da sua composição na cinética de crescimento pós-natal do hospedeiro, quer sob condições nutricionais normais, como na desnutrição.<sup>241-244</sup> Assim, estirpes

bacterianas específicas são capazes de interagir com a atividade do eixo somatotrófico hormona de crescimento/fator de crescimento semelhante à insulina-1 (IGF-1), influenciando diretamente o desenvolvimento do hospedeiro.<sup>241</sup> Em mamíferos, está bem documentado que o crescimento sistêmico pós-natal é impulsionado, em grande parte, pela atividade desse eixo, o qual promove o crescimento orgânico e sistêmico.<sup>245</sup> Estudos revelaram que, sob condições nutricionais normais, a microbiota é essencial para maximizar o ganho de peso sistêmico e o crescimento linear, o que foi verificado em ratinhos machos desmamados.<sup>246</sup> Em condições nutricionais normais e comparando com ratinhos *germ-free*, a microbiota de ratinhos criados convencionalmente melhorou os parâmetros de crescimento ósseo, incluindo o comprimento femoral, a espessura cortical e a fração óssea cortical/trabecular.<sup>245</sup> Neste contexto, argumenta-se que os AGCC microbianos possam constituir um possível mecanismo para o aumento de IGF-1 em ratinhos sob condições nutricionais normais e com parâmetros ósseos melhorados.<sup>246</sup> No que respeita à subnutrição, assinalada no desmame para uma dieta pobre em proteína e gordura, mas isocalórica, observou-se uma completa atrofia nos ratinhos *germ-free*, sem ganho de peso ou comprimento, enquanto que nos ratinhos com microbiota convencional verificou-se um crescimento, embora em menor grau comparando com os de dieta nutricionalmente adequada.<sup>241</sup> Todavia, a exposição a determinadas estirpes bacterianas desempenha um papel decisivo na indução do atraso de crescimento juvenil.<sup>242</sup> Curiosamente, experiências num modelo de ratinho, mimetizando a exposição a antibióticos em idade pediátrica, revelaram uma aceleração significativa no crescimento juvenil e no desenvolvimento ósseo com efeitos metabólicos de desenvolvimento a longo prazo, relacionando com o declínio progressivo da diversidade do microbioma intestinal e das mudanças estruturais das comunidades bacterianas induzidas pelos antibióticos.<sup>243</sup> Em humanos, o tratamento antimicrobiano apresenta um efeito promotor de crescimento documentado em crianças pré-púberes de países de baixa e média renda, mas com um efeito mais pronunciado no crescimento ponderal do que no linear.<sup>247</sup> A associação entre a microbiota intestinal modificada e o aumento do crescimento juvenil é convincente quando comparada com a tendência do aumento estatural na idade adulta desde meados do século passado, culminando com a era dos antibióticos, redes de saneamento básico e melhores cuidados de saúde na população pediátrica. Neste panorama, pressupõe-se o desaparecimento de linhagens microbianas ancestrais e a menor estimulação imunológica durante o período crítico da infância, sendo a energia e os nutrientes disponíveis utilizados para o crescimento, uma vez que não são consumidos pelo sistema imunológico. Em alternativa, os probióticos também têm sido descritos como moduladores positivos do crescimento juvenil em mamíferos,<sup>246</sup> embora com evidências limitadas do efeito benéfico em crianças subnutridas e de países em desenvolvimento, sem qualquer efeito demonstrado no crescimento de crianças de países desenvolvidos.<sup>248</sup> Estudos em animais indicam que o efeito benéfico de

probióticos sobre a promoção do crescimento é estritamente específica da estirpe.<sup>246</sup> Portanto, são necessários mais estudos para discriminar estirpes bacterianas potencialmente benéficas na restauração do crescimento e do desenvolvimento infantil normal, com o objetivo de desenvolver estratégias de modulação da microbiota.<sup>249</sup>

### 2.6.3. FUNÇÕES DE DEFESA DO HOSPEDEIRO

Como já abordado, a microbiota intestinal “pioneira” (Firmicutes, Bacteroidetes, Enterobacteriaceae, *Veillonella* spp. e, particularmente, *Bifidobacterium* spp.) será responsável pela educação inicial do sistema imunológico em evolução, proporcionando um ambiente favorável para o estabelecimento microbiano subsequente, incluindo a produção de um meio anaeróbico e de compostos específicos.<sup>190</sup> Neste sentido, a microbiota comensal integra parte da primeira linha de defesa intestinal, assegurando uma barreira competitiva contra a colonização patogénica invasora – “resistência à colonização”, prevenindo a inflamação gastrointestinal induzida por tais microrganismos.<sup>250</sup> Além de estimular e manter a produção da camada de muco que reveste o epitélio intestinal,<sup>251</sup> bem como modular as respostas imunológicas locais,<sup>250</sup> a microbiota comensal compete por locais de ligação e nutrientes, com produção de metabolitos específicos e peptídeos antimicrobianos, criando um ambiente hostil (pH ácido)<sup>190</sup> para a sobrevivência, estabelecimento e sobrecrecimento de potenciais patógenos, naturalmente presentes em número reduzido no intestino.<sup>160</sup> Estas ações são semelhantes às verificadas para alguns probióticos.<sup>160</sup> Adicionalmente, os mecanismos desencadeados são importantes para a redução do nível de LPS, peptidoglicanos, motivos CpG-DNA bacterianos e superantígenos, os quais são, potencialmente, prejudiciais para o hospedeiro.<sup>22</sup>

Resumindo algumas evidências: a) *Bacteroides thetaiotaomicron*, abundante anaeróbio no cólon, consome hidratos de carbono usados pelo *Citrobacter rodentium*, o que contribui para a exclusão competitiva do patógeno do lúmen intestinal;<sup>252</sup> b) *Bacillus thuringiensis* segrega uma bacteriocina que afeta diretamente *Bacillus* spp. e *Clostridium* spp. formadores de esporos, como o *Clostridium difficile*;<sup>253</sup> c) o LPS e a flagelina derivados das bactérias comensais promovem a expressão do peptídeo antimicrobiano e de RegIIIy (lecitina do tipo c que ataca seletivamente bactérias Gram-positivas, ou modifica substâncias endógenas, como sais biliares, tornando-os tóxicos para essas) a partir de células epiteliais, estimulando recetores TLR-4 de células estromais e TLR-5/CD103 de células dendríticas;<sup>254</sup> d) *Candidatus arthromitis* (ou bactéria filamentosa segmentada) promove a secreção de IgA a partir de células B, a produção de peptídeos antimicrobianos e o desenvolvimento de células Th-17 na mucosa intestinal.<sup>255</sup>

#### 2.6.4. FUNÇÕES ESTRUTURAIS E HISTOLÓGICAS

A evidência disponível indica que a microbiota desempenha um papel crucial no estabelecimento e regulação da barreira mucosa intestinal.<sup>256</sup> A camada de muco que reveste as células epiteliais reflete o equilíbrio entre a secreção de muco e a degradação bacteriana, constituindo um obstáculo à captação de antígenos e moléculas pró-inflamatórias.<sup>22</sup> O revestimento mucoso possui dois componentes: a) camada externa menos densa contendo moléculas protetoras (sIgA e defensinas) e bactérias comensais com capacidades anti-patogênicas; b) camada interna, próxima à superfície de epitélio e muito densa, que não possui microrganismos ou moléculas protetoras, atuando como uma barreira física à penetração de patógenos no epitélio.<sup>9</sup> Portanto, o sistema imunológico inato do hospedeiro permite manter a esterilidade da camada de muco que reveste o epitélio intestinal. A segregação física espacial entre o lúmen rico em bactérias e o epitélio intestinal constitui um exemplo pelo qual o sistema imunológico inato mantém a tolerância à microbiota intestinal, limitando o contato com o sistema imunológico adaptativo, como mencionado anteriormente.<sup>213</sup> Assim, esta zona estéril protege contra a estimulação e a inflamação imunológica contínuas, aumentando a função de barreira da camada epitelial.<sup>9</sup> De facto, evidências mostram uma associação inversa entre a espessura do revestimento mucoso e a inflamação intestinal, particularmente na DII.<sup>257</sup> Numerosos fatores imunológicos e não-imunológicos contribuem para a função de barreira da mucosa e a microbiota intestinal fornece os estímulos para a manutenção deste importante componente.<sup>9</sup> Assim, foi observado que animais *germ-free* possuem uma camada de muco mais fina, em comparação com a de animais criados convencionalmente.<sup>213</sup> Os fatores estimulados pelas bactérias colonizadoras incluem: secreção de substâncias antibacterianas (ex.: defensinas) por células de Paneth,<sup>9</sup> glicoproteínas e uma barreira de muco induzida por genes MUC-2 expressos em células caliciformes,<sup>258</sup> receptores de reconhecimento de padrões (ex.: TLR) em células epiteliais e imunológicas e um epitélio especializado (*microfold* ou célula M) para mediar o acesso antígeno/bactéria do lúmen intestinal para elementos linfóides apropriados (ex.: linfócitos intraepiteliais, macrófagos e células dendríticas).<sup>9</sup> Evidências indicam que o butirato reforça a barreira de defesa intestinal, induzindo a secreção de mucinas, fatores trefoil e peptídeos antimicrobianos.<sup>22</sup> Adicionalmente, foi observado que determinados probióticos (ex.: do género *Lactobacillus* spp.) apresentam a capacidade de estimular a produção de mucina<sup>251</sup> por ligação a células do epitélio intestinal.<sup>259</sup> Mack *et al.* (1999) verificou a inibição da aderência de *Escherichia coli* enterohemorrágica O157:H7 e *Escherichia coli* enteropatogénica a células epiteliais *in vitro* por determinados probióticos.<sup>251</sup>

Por outro lado, as células do epitélio intestinal produzem RegIIIγ de forma dependente de MyD88, cujo alvo são bactérias Gram-positivas, como abordado anteriormente. A MyD88 é uma proteína adaptadora na via TLR, sendo necessária e suficiente para manter a separação e prevenir

que as bactérias interajam com as células epiteliais.<sup>259</sup> Ratinhos *knockout* RegIIly exibiram um incremento nas respostas imunológicas adaptativas, como evidenciado pelo aumento de IgA fecal e de células Th1 na lâmina própria, respostas essas dependentes da presença da microbiota intestinal.<sup>213</sup>

Por último, algumas comunidades bacterianas podem fortalecer a barreira intestinal ao nível das junções *tight*/ocludentes (i.e. *clusters* proteicos que formam uma barreira entre o lúmen intestinal e a lâmina própria). Por sua vez, o butirato microbiano regula o crescimento e a diferenciação celulares, inibindo o crescimento celular anormal, enquanto promove a reversão de células com um fenótipo neoplásico para um fenótipo não neoplásico.<sup>22</sup> Complementarmente, os microrganismos comensais promovem a cicatrização epitelial<sup>260</sup> e moldam o desenvolvimento da microvasculatura das vilosidades.<sup>261</sup>

#### 2.6.5. EIXO MICROBIOTA-INTESTINO-CÉREBRO

Recentemente, inúmeros estudos evidenciaram uma significativa influência da microbiota na sinalização bidirecional que ocorre entre o intestino e o sistema nervoso central (SNC), sendo essa comunicação conhecida por eixo microbiota-intestino-cérebro (*Figura 20*).<sup>262</sup> Primariamente, estabelecem-se interações entre os microrganismos intestinais e as vias psiconeuroimunológicas, integrando vias neurais (nervo vago) com mecanismos imunológicos (citocinas) e endócrinos [eixo hipotálamo-hipófise-suprarrenal (HPA)], numa relação complexa essencial para manter a homeostasia.<sup>2</sup> Neste sentido, a microbiota intestinal pode influenciar a função cerebral e conduzir a alterações comportamentais, como extensivamente demonstrado nos últimos anos, utilizando modelos animais.<sup>263</sup> De facto, esta relação torna-se possível porque o microbioma intestinal contribui para um estado inflamatório sistémico no hospedeiro, apesar de mantida a integridade da barreira intestinal. Assim, um número reduzido de bactérias e componentes da parede celular bacteriana (ex.: LPS - poderoso estímulo inflamatório) cruza a interface microbiota-intestino e extravasa para a cavidade peritoneal. Determinados microrganismos, particularmente bactérias Gram-negativas (ex.: Enterobacteriaceae e Pseudomonadaceae), são capazes de estimular uma resposta inflamatória sistémica mais robusta e, por isso, quando dominantes no intestino, podem promover um estado pró-inflamatório sistémico de baixo grau e crónico.<sup>2</sup> Em lactentes humanos, uma relação inversa entre a colonização intestinal com *Lactobacillus* spp. (potencial anti-inflamatório intestinal) e os níveis de interferão (IFN)- $\gamma$ , IL-10 e IL-4 foi relatada, enquanto que a colonização com *Staphylococcus aureus* foi associada a níveis elevados de citocinas,<sup>264</sup> sugerindo que a disbiose intestinal pode afetar o sistema imunológico em desenvolvimento, como mencionado anteriormente. Uma vez libertadas, as citocinas inflamatórias sistémicas exercem efeitos sobre o SNC e modulam o humor, a resposta ao *stress* e o comportamento, iniciando os



“sickness behaviors” (ex.: fadiga, insônia, anorexia e depressão).<sup>2</sup> Por outro lado, os microrganismos intestinais podem afetar a integridade das barreiras intestinal e hematoencefálica, particularmente pela produção de AGCC, o que pode facilitar a translocação de metabolitos e mediadores imunológicos bacterianos do intestino para a circulação, com a ativação subsequente da micróglia (as células imunológicas residentes do cérebro), como observado na disbiose induzida num modelo de ratinho.<sup>265</sup> Adicionalmente, a microbiota intestinal sintetiza metabolitos neuroativos (*Tabela VII*): o ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) por *Lactobacillus* spp. e *Bifidobacterium* spp.,<sup>266</sup> a acetilcolina por *Lactobacillus* spp., a dopamina por *Bacillus* spp. e *Serratia* spp., e a noradrenalina por *Escherichia* sp. e *Saccharomyces* spp., os quais podem modular a atividade e a função do sistema nervoso entérico (SNE) e do nervo vago, afetando potencial e diretamente as redes neuronais ao longo do corpo, incluindo o cérebro.<sup>262</sup> Além disso, a microbiota intestinal está implicada no controlo das concentrações sanguíneas do triptofano, por provável modulação da via da quinurenina. Este aminoácido essencial é fundamental para o desenvolvimento do SNC e regula o comportamento normal do recém-nascido, constituindo um precursor da serotonina – um neurotransmissor que intercede na função gastrointestinal, no apetite, no humor, no sono e na ansiedade. Por outras palavras, a microbiota intestinal influencia, indiretamente, a síntese e o metabolismo da serotonina.<sup>232</sup>

Por outra instância, a composição do microbioma intestinal afeta o eixo HPA, ao influenciar a secreção de cortisol e o desenvolvimento normal da resposta ao *stress*,<sup>267</sup> habitualmente por efeitos indiretos na estimulação de citocinas pró-inflamatórias, as quais são capazes de ativar todos os níveis deste eixo.<sup>2</sup> Contudo, elevados níveis de glucocorticoides apresentam um impacto negativo na estrutura e função cerebrais em áreas relevantes para o desenvolvimento cognitivo e emocional.<sup>2</sup> O *stress* no início de vida, incluindo o *stress* materno pré-natal, pode induzir disbiose intestinal no lactente e influenciar as respostas imunológicas subsequentes, como demonstrado em modelos de *stress* face à separação materna.<sup>268</sup> Estudos em animais<sup>269</sup> e em humanos<sup>270</sup> evidenciaram uma associação positiva entre os níveis de *stress* e os níveis de estirpes patogénicas de *Escherichia* sp. e *Enterobacter* spp., e uma relação inversa com níveis de bactérias benéficas, como *Lactobacillus* spp. ou *Bifidobacterium* spp., no microbioma intestinal do lactente. Neste contexto, outros estudos sugerem que os níveis aumentados de cortisol que acompanham quer o *stress* agudo, quer o *stress* crónico, podem aumentar a permeabilidade intestinal, com consequente escape do LPS bacteriano através da parede intestinal, estabelecendo-se um ciclo indesejável de *feedback* positivo entre o *stress* crónico, o microbioma e a inflamação sistémica.<sup>271</sup> Como implícito, a exposição ao *stress* crónico reduz a diversidade do microbioma intestinal e afeta a abundância relativa de vários tipos bacterianos, correlacionando-se significativamente com o aumento de citocinas pró-inflamatórias, incluindo a IL-6 e o fator de necrose tumoral (TNF)- $\alpha$ .<sup>269</sup> A exposição a

essas citocinas tem sido associada a danos no cérebro em desenvolvimento, interferindo com a substância branca e a plasticidade cerebral.<sup>2</sup>

No que respeita à via neural do eixo microbiota-intestino-cérebro, há uma comunicação através das fibras aferentes e eferentes do nervo vago, o qual inerva e regula o intestino, mantém a homeostasia sistêmica, promove efeitos anti-inflamatórios e influencia diretamente o SNC e o comportamento, por interação com o eixo HPA e mediadores inflamatórios.<sup>269</sup> Pelas vias aferentes há uma transmissão vagal de sinais inflamatórios para o SNC, contribuindo para os sintomas afetivos e respostas comportamentais.<sup>2</sup> A ativação das fibras eferentes, por sua vez, promove sinais anti-inflamatórios para a periferia, através da “via anti-inflamatória colinérgica”, reduzindo a produção de citocinas pró-inflamatórias e modulando as atividades de células efectoras intestinais.<sup>272</sup> Assim, compreende-se que sinais emocionais ou de *stress* do SNC influenciem a composição, diversidade e a função da microbiota intestinal, atuando indiretamente por alterações na motilidade, na secreção de muco ou na permeabilidade intestinais, ou diretamente por moléculas sinalizadoras libertadas no lúmen do intestino, já que determinadas espécies bacterianas intestinais possuem recetores responsivos a neurotransmissores e neuromoduladores.<sup>232</sup>

Pelo mencionado, torna-se evidente que eventos precoces possam sustentar desequilíbrios na comunicação entre o cérebro e o intestino, os quais podem afetar o desenvolvimento cerebral e o comportamento da criança.<sup>273</sup> No entanto, estudos demonstram que a administração de probióticos aumenta o comportamento exploratório em ratinhos sob condições variadas,<sup>274,275</sup> incluindo o tratamento probiótico após colite induzida.<sup>276</sup> Adicionalmente, défices na memória de trabalho<sup>277</sup> e no funcionamento social<sup>278</sup> ocorrem em ratinhos *germ-free*, os quais podem ser revertidos pela colonização microbiana pós-desmame com probióticos, sugerindo que o atraso no desenvolvimento associado ao microbioma pode ser modificável. Estes dados são explicados pela influência que a introdução de probióticos desempenha na expressão génica no SNC, alterando especificamente a expressão de recetores do GABA no hipocampo, mediada por estimulação do nervo vago.<sup>279</sup>

Em suma, evidências crescentes sugerem que o microbioma intestinal desempenha um papel fundamental no funcionamento cerebral, desde a cognição à ansiedade, humor e sociabilidade. Apesar de vários distúrbios neurológicos serem associados à disbiose intestinal, são necessárias investigações adicionais para perceber se a alteração observada é a causa, ou a consequência, da doença expressa. Por isso, uma melhor compreensão de como o eixo microbioma-intestino-cérebro opera durante a infância pode fornecer novos *insights* sobre o desenvolvimento neurocognitivo e socio-emocional em idade pediátrica.<sup>2</sup>

### 3. BIOMARCADORES MICROBIANOS ASSOCIADOS À SAÚDE EM IDADE PEDIÁTRICA

Considerando o que foi mencionado anteriormente, compreende-se a existência de um período crítico nos primeiros meses de vida, durante o qual a rutura do equilíbrio microbiano intestinal pode ter consequências duradouras, resultando em distúrbios imunológicos.<sup>213</sup> Alterações na microbiota intestinal ao longo de um processo de doença – designadas por biomarcadores microbianos – podem ser aplicadas em testes de diagnóstico e de prognóstico, permitindo identificar estádios de pré-doença e de doença efetiva, embora sejam necessários mais estudos para compreender os mecanismos exatos e as causalidades da *crosstalk* microbiota-intestino. Como biomarcadores da saúde intestinal em idade pediátrica incluem-se: a maturação e a diversidade da microbiota; a presença e abundância de *Bifidobacterium* spp.; a presença e abundância de bactérias produtoras de butirato, as quais pertencentes às famílias Lachnospiraceae e Ruminococcaceae; a acidez como resultado do metabolismo de bifidobactérias e de bactérias ácido-láticas (concentração de AGCC e pH); e lípidos e proteínas microbianos. Numa breve abordagem sobre estes biomarcadores, começa por explicar-se o papel da maturação microbiana. Assim, uma microbiota dita “madura” inclui determinadas comunidades microbianas que são características de uma dada faixa etária pediátrica (estádios de sucessão microbiana dependentes da idade), enquanto que uma microbiota dita “imatura” se assemelha à de uma criança de menor idade. Portanto, é fácil compreender que uma maturação tardia da microbiota estará associada a distúrbios fisiológicos no hospedeiro, embora este biomarcador não seja particularmente específico, já que são descritas diferenças na estrutura de uma comunidade ou diferenças na transição de toda a microbiota. Por outro lado, os desvios na transição da microbiota num lactente como, por exemplo, uma menor diversidade em determinados estádios de sucessão microbiana, constituem uma medida para avaliar o risco precoce de certas doenças.<sup>1</sup> Neste contexto, um aumento menos acentuado na diversidade microbiana nas primeiras semanas de vida está associado à cólica infantil, cuja manifestação é mais pronunciada nas primeiras 6 semanas após o nascimento, com uma abundância significativamente menor de *Bifidobacterium* spp. e *Lactobacillus* spp.,<sup>280</sup> cujos fatores causais foram previamente discutidos. Além da cólica infantil, a ECN, a obesidade tardia, a doença celíaca e doenças autoimunes estão correlacionadas com níveis diminuídos de *Bifidobacterium* spp. no intestino do lactente,<sup>281</sup> pelo que a presença e a abundância de bactérias deste género, descritas como associadas a um estado de saúde positivo, podem ser consideradas um potencial biomarcador microbiano.<sup>1</sup> Adicionalmente, a desnutrição em idade pediátrica é, tipicamente, caracterizada por uma menor abundância de *Bifidobacterium longum*, estando relacionada a um risco aumentado de perturbações na capacidade de aprendizagem e desnutrição física posterior.<sup>282</sup> Por outro lado, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* demonstrou proteção contra infeções respiratórias em crianças.<sup>283</sup> Neste cenário, sugere-se que a capacidade

de proteção das bifidobactérias contra doenças precoces funcione mediante estimulação imunológica específica e acidificação do ambiente intestinal, nomeadamente pela produção de AGCC e lactatos. Logo, o aleitamento materno confere um pH fecal mais baixo no lactente, em comparação com o leite de fórmula, acreditando-se que uma maior acidificação intestinal precoce diminua a propensão de colonização por patógenos.<sup>284</sup> Todavia, não está ainda esclarecido se estirpes específicas ou uma comunidade diversificada e distinta de bifidobactérias promovem efeitos diferentes. Pelo referido, as bactérias do género *Bifidobacterium* spp. podem ser usadas como um biomarcador para avaliar o estado intestinal em relação a uma hipotética disbiose, além de que o aumento dos seus níveis no TGI pode ser considerado um alvo para prevenir e/ou aliviar doenças.<sup>1</sup> Outro biomarcador da saúde intestinal em idade pediátrica é a assinatura de bactérias produtoras de butirato, cuja colonização em número reduzido durante a *early-life* é considerada uma vantagem para a transição rápida de microrganismos que ocorre no processo de desmame do lactente, transitando de uma microbiota dominada por *Bifidobacterium* spp. para uma microbiota rica em *Bacteroides* spp. e *Clostridium* spp., como já descrito antes. Por último, diferenças na composição da membrana externa de microrganismos Gram-negativos são aplicadas como uma primeira ferramenta para identificar isolados patogénicos.<sup>1</sup> Estas bactérias induzem uma resposta inflamatória mais intensa do que as Gram-positivas,<sup>221</sup> provavelmente pelo facto de o LPS ser um precursor das respostas inflamatórias do hospedeiro. Desta forma, uma maior abundância de bactérias Gram-negativas, como as do *phylum* Proteobacteria, tem sido associada a cólica, a obstipação e a dermatite atópica no lactente.<sup>280,285</sup> Noutro contexto, dados recentes indicam que o LPS de *Bacteroides dorei* possui lípido A na forma penta ou tetra-aciladas, apresentado características imuno-inibitórias, em oposição ao lípido A hexa-acilado detetado na *Escherichia coli*. Em consideração a este aspeto, verificou-se que crianças de países com elevada suscetibilidade à autoimunidade possuem, mais frequentemente, essas espécies de *Bacteroides* spp. na sua microbiota intestinal, argumentando-se que as propriedades imuno-inibitórias do LPS podem prejudicar a educação precoce do sistema imunológico intestinal e contribuir para o desenvolvimento de diabetes *mellitus* tipo 1.<sup>286</sup>

#### 4. DISBIOSE INTESTINAL E PATOLOGIAS ASSOCIADAS EM IDADE PEDIÁTRICA

A disbiose, i.e., uma colonização anormal do intestino caracterizada por uma diminuição da diversidade de espécies bacterianas e alterações na composição taxonómica, pode ocorrer com frequência durante o processo inicial de colonização de um recém-nascido.<sup>77</sup> Assim, o estado disbiótico providencia bactérias colonizadoras que, por um lado, não ativam a função imunoprotetora adequada ou, por outro lado, estimulam uma resposta imunológica perturbada (i.e. desequilíbrio linfocítico ou regulação celular excessiva que favorece condições inflamatórias).

Como resultado, o intestino em desenvolvimento estabelece respostas imunológicas anormais a estímulos comuns, potenciando a expressão de doenças crônicas numa fase posterior da vida, incluindo doenças imunomediadas. Atualmente, defende-se que a disbiose é um dos principais contribuintes para a mudança no paradigma de doença nos países desenvolvidos, observada nas últimas décadas. Embora esteja estabelecido um componente genético para a disbiose na colonização do recém-nascido, os fatores ambientais (ex.: dieta e *stress*) são considerados um fator contribuinte fundamental. Adicionalmente, a natureza da exposição inicial à microbiota no período perinatal [parto por cesariana ou internamento prolongado na Unidade de Cuidados Intensivos Neonatais (UCIN)] apresenta uma grande influência. Além disso, práticas médicas como a prescrição de antibióticos, a vacinação e ambientes excessivamente limpos podem prejudicar o processo inicial de colonização. Todas estas circunstâncias mencionadas perturbam o desenvolvimento apropriado da homeostasia intestinal e favorecem os processos de doença que ocorrem com a inflamação.<sup>9</sup>

O processo de colonização anormal (*Tabela VIII*) difere notavelmente do processo normal. Como resultado do parto pré-termo, do parto por cesariana e da exposição à PAI, a colonização inicial resulta numa primeira fase escassa e inadequada do processo de colonização. Neste contexto, e já que a fase neonatal é crítica para o processo de colonização inicial, qualquer interrupção nesta etapa pode culminar em disbiose. Posteriormente, apesar do estímulo da alimentação oral e do desmame para alimentos sólidos, a maturação completa da colonização intestinal, sob essas condições, é adiada até os 4-6 anos de vida. Durante esse período de tempo, a criança torna-se mais suscetível a doenças infecciosas e imunomediadas.<sup>105</sup>

Apesar de não ser do âmbito desta dissertação efetuar a descrição detalhada das várias patologias associadas à disbiose em idade pediátrica, é apresentado um resumo dessa associação na *Tabela IX*. Complementarmente, na *Figura 21* são indicados os fatores predisponentes do desenvolvimento de ECN num intestino imaturo; na *Tabela X* e na *Figura 22* são expostas as alterações da microbiota intestinal e as respostas imunológicas observadas na DII; na *Figura 23* são assinalados os diferentes mecanismos pelos quais a disbiose intestinal pode potenciar à obesidade; e, finalmente, na *Tabela XI* são mencionadas as exposições perinatais potenciadoras do desenvolvimento de asma, por perturbação da colonização microbiana intestinal.

## 5. CONCLUSÃO

Uma microbiota intestinal “equilibrada” é fundamental para manter o hospedeiro saudável. A colonização e o estabelecimento do ecossistema microbiano intestinal do lactente, bem como a sua composição, desempenham um papel primordial no desenvolvimento metabólico e

imunológico da criança. A microbiota intestinal representa um excelente exemplo de como um ambiente considerado estéril ao nascimento, ou pelo menos pobremente colonizado, é rapidamente ocupado por uma infinidade de comunidades microbianas. Esta colonização parece seguir um trajetória típica que é dirigida por processos estocásticos e forças de coevolução micróbio-hospedeiro humano. O desenvolvimento subsequente é modulado por fatores perinatais maternos e pela genética do hospedeiro, além de outros fatores, incluindo a via de nascimento, o ambiente em torno do nascimento, a prematuridade, medidas de higiene e o tipo de alimentação, entre outros. Compostos dietéticos específicos presentes no leite materno – fonte prebiótica natural, suportam a colonização seletiva por espécies microbianas benéficas, particularmente do gênero *Bifidobacterium* spp. Não obstante, há indícios intrigantes de que o intestino do neonato nem sempre é estéril ao nascimento e que a colonização fetal pode ocorrer, com uma transferência da microbiota materna para o feto durante a gravidez.

Nos últimos anos, inúmeros estudos demonstraram uma associação causal entre uma redução da diversidade microbiana e/ou uma composição aberrante da microbiota intestinal e uma série de doenças intestinais em lactentes, como a ECN, bem como outras condições patológicas na criança [ex.: obesidade infantil, distúrbios alérgicos e perturbação do espectro do autismo (PEA)] e na idade adulta (ex.: DII e os distúrbios metabólicos). Por conseguinte, existem dados preliminares que sugerem que a microbiota intestinal humana inicial influencia os fatores de risco relacionados às condições de saúde da infância e do adulto. Sem embargo, para a maioria das patologias onde a relação com a disbiose foi demonstrada, verifica-se ainda a questão do “ovo e da galinha”: qual o gatilho para a deterioração? Desse modo, ecoa a necessidade para estudos de coorte mais amplos e que visem a pesquisa do microbioma em idade pediátrica e do metaboloma desde o nascimento e durante, pelo menos, o primeiro ano de vida. Os primeiros estádios da vida representam um período oportunista, normalmente, livre de doenças associadas à disbiose, mas com alterações microbianas e metabólicas que podem explicar o processo de desenvolvimento patológico tardio, onde as intervenções terapêuticas poderão ter um impacto mais profundo e duradouro na saúde e na prevenção da doença. Portanto, uma vez que a criança suporta uma drástica sucessão de mudanças microbianas ao longo de meses, é claramente importante compreender como e quando essas mudanças ocorrem. Não obstante, o entendimento sobre os efeitos a longo prazo da disbiose precoce implica que os dados clínicos sejam coletados, idealmente, durante toda a vida humana.

Noutra instância, explorar os perfis metagenômicos e metabolômicos que resultam das mudanças microbianas precoces pode fornecer uma melhor compreensão do papel da microbiota e das suas moléculas no processo patológico, com a identificação de biomarcadores microbianos. Esta percepção revela ser um grande desafio para futuras abordagens profiláticas, bem como para o diagnóstico precoce de doenças ainda não manifestadas clinicamente.

Por outro lado, foi demonstrada uma inter-relação próxima entre a dieta, o microbioma e o sistema imunológico, pelo que muitos dos distúrbios associados a uma microbiota aberrante ou a respostas imunológicas inadequadas são alvos potenciais de intervenção pré- e probiótica, as quais direcionadas para prevenir e/ou neutralizar a disbiose. Todavia, ainda não existem indicações clínicas específicas para as diferentes condições suscetíveis de prevenção ou melhoria por probióticos, sendo necessárias investigações adicionais para compreender e desenvolver probióticos específicos e uniformes antes da elaboração de protocolos aplicáveis na prática clínica.

## 6. APÊNDICE

Tabela I. Modelos *in vitro* e *in vivo* da microbiota intestinal humana - potenciais e limitações<sup>287-291</sup>

Modelos	Descrição	Principal aplicação	Limitações	Referências
<b><i>In vitro</i></b>				
Sistema de carga estático	Fezes frescas ou conteúdo do cólon suspensos em solução tampão	Estudos metabólicos e enzimáticos de curto prazo	- Mudança rápida na composição do ecossistema	Rumney e Rowland (1992)
Sistema de carga semicontínuo	- Sistema de cultura quimioestático de fluxo semicontínuo - Inoculação de bactérias definidas, fezes ou conteúdo do cólon	Estudos de longo prazo de fermentação metabólica, ecológica e dietética	- Os fatores do hospedeiro são ignorados - A estabilidade do ecossistema é assumida	Rumney e Rowland (1992)
Sistema de carga contínuo	- Sistema de cultura quimioestático de fluxo contínuo - Inoculação de bactérias definidas, fezes ou conteúdo do cólon	Estudos de longo prazo sobre características metabólicas, ecológicas e dietéticas da microbiota GI	- Os fatores do hospedeiro são ignorados - Sistema complexo de configurar - A estabilidade do ecossistema é assumida	Martoni <i>et al.</i> (2008)
<b><i>In vivo</i></b>				
Animais de laboratório	Fezes frescas ou conteúdo do cólon de animais com microbiota convencional	Estudos metabólicos, ecológicos e pré-clínicos	- Diferenças na composição da microbiota intestinal entre animais e humanos	Li <i>et al.</i> (2008)
Animais gnotobióticos	- Animais de laboratório <i>germ-free</i> colonizados com organismos definidos ou microbiota transferida de um animal de laboratório ou de um voluntário humano	Estudos de interação bactéria-bactéria e bactéria-hospedeiro	- Alteração de interações bacterianas	Quigley (2007)
Voluntários humanos	Fezes frescas ou conteúdo do cólon de voluntários humanos	Estudos metabólicos, ecológicos, químicos e clínicos	- Problemas éticos - Relevância das fezes/conteúdo do cólon para representar a microbiota global do TGI	Kang <i>et al.</i> (2010)



Tabela II. Técnicas disponíveis para a caracterização da microbiota intestinal humana<sup>50,53,68,292</sup>

Técnicas	Descrição	Aplicações	Limitações	Referências
Métodos de cultura	Meios definidos para isolamento de colónias bacterianas	Quantificação/caracterização de colónias isoladas	- Bactérias não cultiváveis - Nível espécie/estirpe dificilmente detetado - Laborioso	Sekirov <i>et al.</i> (2010)
Sequenciação do gene 16S rRNA	Sequenciação ao nível de espécie/estirpe	Identificação bacteriana	- Análise de dados extensiva	Sekirov <i>et al.</i> (2010)
DGGE	Sistema de eletroforese em gel com gradiente de desnaturação, usando pequenos amplicões de PCR a partir do DNA extraído das colónias	Estudos comparativos	- Os amplicões de PCR são muito pequenos para sequenciar informação	Sekirov <i>et al.</i> (2010)
T-RFLP	Sistema de eletroforese em gel com gradiente de desnaturação, usando amplicões de PCR <i>full-length</i> do gene 16S rRNA a partir do DNA extraído das colónias	Comparação de colónias	- Resolução taxonómica limitada	Sekirov <i>et al.</i> (2010)
RISA	Amplificação por PCR da região IS entre os genes 16S e 23S rRNA, os quais hibridizados com <i>primers</i> marcados por fluorescência	Caracterização de colónias bacterianas complexas	- Identificação bacteriana complexa - Ausência de um banco de dados extensivo	Sekirov <i>et al.</i> (2010)
FISH	Hibridização de sondas oligonucleotídicas marcadas por fluorescência para o gene 16S rRNA específico de bactérias alvo	Quantificação de grupos/espécies bacterianas alvo	- Novas espécies/estirpes não identificadas	Sekirov <i>et al.</i> (2010)
CARD-FISH	Método FISH modificado: amplificação <i>in situ</i> com peroxidase de rábano	Quantificação bacteriana se FISH for inadequado	- Novas espécies/estirpes não identificadas	Peter e Sommaruga (2008)
Hibridização <i>in situ</i> com microscopia eletrónica de varrimento	Combinação da hibridização <i>in situ</i> com a microscopia eletrónica de varredura	Quantificação de grupos/espécies bacterianas alvo	- Novas espécies/estirpes não identificadas	Peter e Sommaruga (2008)
PCR quantitativo	Grupos/espécies bacterianas específicas alvo a partir de uma mistura de culturas por <i>primers</i> de PCR quantitativo	Estudos quantitativos de sistema complexo	- Novas espécies/estirpes não identificadas - Necessária estirpe para curva padrão	Sekirov <i>et al.</i> (2010)
Microarranjo de DNA	Coleção de pontos regulares de elementos de reconhecimento de DNA posicionados em lâminas microscópicas	<i>Screening</i> de colónias microbianas intestinais humanas	- Baixo limite de deteção - Viés de hibridização - Novas espécies/estirpes não identificadas	Sekirov <i>et al.</i> (2010)
Marcação de sonda isotópica estável	Análise de componentes celulares marcados com isótopos	Estudos de RNA e DNA marcados com C <sup>13</sup>	- Baixa resolução da ultracentrifugação em gradiente de densidade - Fornecimento comercial limitado de isótopos rotulados	Gong e Yang (2012)
Metagenómica	Extração total do DNA de uma colónia	Estudo compressivo da estrutura e da função do gene	- Não permite distinguir células mortas de células vivas	Gong e Yang (2012)
Metatranscriptómica	RNA isolado diretamente a partir de uma colónia complexa	Análise de genes expressos	- Dispendioso - Sensível	Gong e Yang (2012)
Metaproteómica	Extração e separação de proteínas a partir de uma colónia complexa	Deteção e identificação de diversas proteínas	- Distribuição irregular de espécies - Problemas de purificação	Gong e Yang (2012)
Metametabolómica	Estudo da função através do levantamento de perfis metabólicos	Análise de metabolitos	- Complicações na análise de vários metabolitos	Gong e Yang (2012)
Culturómica	Múltiplas condições de cultura de alto rendimento, usando espectrometria de massa ou sequenciação de 16S rRNA	Identificação de espécies bacterianas previamente não cultiváveis	- Por comparação, laboralmente mais intensivo	Lagier <i>et al.</i> (2016)
Modelos animais	Modelo animal transgénico e <i>knockout</i>	Fornecer modelo animal simplificado para estudo das complexidades biológicas	- Dispendioso - Não reflete verdadeiras alterações	Gong e Yang (2012)

CARD: deposição de repórter catalisado (do inglês: *catalyzed reporter deposition*); DGGE: sistema de eletroforese em gel com gradiente de desnaturação (do inglês: *denaturing gradient gel electrophoresis*); FISH: hibridação fluorescente *in situ* (do inglês: *fluorescence in situ hybridization*); T-RFLP: polimorfismo de comprimento de fragmentos terminais de restrição (do inglês: *terminal restriction fragment length polymorphism*); RISA: análise do espaçador intergénico do rRNA (do inglês: *ribosomal RNA intergenic spacer analysis*)

*Tabela III.* Fases de colonização do intestino em idade pediátrica. Adaptado com a autorização de Walker (2017)<sup>9</sup>

---

⇒ <b>Fase 1: Período intrauterino</b>	Colonização parcial – o feto é exposto à microbiota materna por passagem transplacentária para o líquido amniótico
⇒ <b>Fase 2: 1.<sup>a</sup> semana de vida</b>	O recém-nascido é exposto e adquire a microbiota materna vaginal e colónica através do canal de nascimento (a termo, parto vaginal)
⇒ <b>Fase 3: 2.<sup>a</sup> semana ao 4.<sup>o</sup> mês de vida</b>	Introdução à alimentação oral (leite materno <i>versus</i> leite de fórmula)
⇒ <b>Fase 4: 4.<sup>o</sup> mês a 1 ano de idade</b>	Período de desmame para alimentos sólidos
⇒ <b>Fase 5: 1 a 3 anos de idade</b>	Maturação da colonização completa: a criança come a refeição da família e o seu microbioma intestinal passa a assemelhar-se ao do intestino adulto (diversidade bacteriana > 1000 diferentes espécies)

---

*Tabela IV.* Fatores do estilo de vida moderno associados, potencialmente, a alterações na microbiota intestinal em idade pediátrica. Adaptado com a autorização de Zuo *and* Ng (2018)<sup>293</sup>

<b>Estilo de vida moderno</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Frequentemente, vivem em meio ambiente urbano, rodeado de cimento</li> <li>- Crescimento na urbanização e migração para áreas urbanas</li> <li>- Nascimento em hospital; taxa crescente de parto por cesariana</li> <li>- Famílias pequenas</li> <li>- Saneamento: ambiente colonizado por microrganismos resistentes (incluindo bactérias, fungos e ácaros)</li> <li>- Exposição precoce aos antibióticos</li> <li>- Lavagem frequente do corpo com água quente e sabão</li> <li>- Baixa taxa de colonização por <i>Helicobacter pylori</i></li> <li>- Declínio do parasitismo endêmico</li> <li>- Alimentos conservados por refrigeração</li> <li>- Consumo de alimentos processados e aditivos alimentares</li> <li>- Aumento da poluição nos países em desenvolvimento</li> </ul>
<b>Estilo de vida tradicional</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Parto vaginal em casa</li> <li>- Famílias grande, lotação</li> <li>- Vivem em ambiente rural em contato com microrganismos do solo</li> <li>- Colonização ancestral do meio ambiente</li> <li>- Sem exposição a antibióticos durante a infância</li> <li>- Acesso limitado a água quente e sabão</li> <li>- Elevada taxa de colonização por <i>Helicobacter pylori</i></li> <li>- Parasitismo comum</li> <li>- Alimentos conservados por fermentação microbiana</li> <li>- Consumo de alimentos naturais</li> </ul>

*Tabela V.* Benefícios do leite materno na colonização intestinal do lactente. Adaptado com a autorização de Houghteling *and* Walker (2015)<sup>213</sup>

<b><u>Probiótico</u></b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Bactérias provenientes do intestino materno colonizam diretamente o intestino do bebê</li> </ul>
<b><u>Prebiótico</u></b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Oligossacarídeos indigeríveis</li> </ul>
<b><u>Imunidade inata</u></b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Peptídeos antimicrobianos, lactoferrina e lisozima</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ sCD14 reconhece o lipopolissacarídeo</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ TLR2 solúvel</li> </ul>
<b><u>Imunidade adaptativa</u></b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ sIgA específica para patógenos encontrados no intestino materno</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Glicanos atraem moléculas de adesão celular</li> </ul>

(sIg: imunoglobulina secretora; sCD: *cluster* de diferenciação, forma solúvel; TLR: receptores do tipo Toll)

*Tabela VI.* Fatores imunológicos e microbianos presentes no leite materno. Adaptado com a autorização de Dzidic *et al.* (2018)<sup>190</sup>

Moléculas bioativas	Células	Microrganismos
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Oligossacarídeos</li> <li>▪ Imunoglobulinas: sIgA, sIgG, sIgM</li> <li>▪ Lactoferrina e lactoferricina</li> <li>▪ Lisozima</li> <li>▪ <math>\alpha</math>-Lactalbumina</li> <li>▪ Caseínas (<i>k</i>-caseína)</li> <li>▪ Citocinas: 1<math>\beta</math>, IL-6, IL-8, IL-10</li> <li>▪ TGF-<math>\beta</math></li> <li>▪ sCD14</li> <li>▪ Complexo de reconhecimento do LPS</li> <li>▪ Mucinas</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ <u>Leucócitos</u> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Macrófagos (40-50%)</li> <li>- Neutrófilos polimorfonucleares (40-50%)</li> <li>- Linfócitos (5-10%)                             <ul style="list-style-type: none"> <li>• Células T (80% do total de linfócitos)</li> </ul> </li> </ul> </li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Predominantemente,                             <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Staphylococcus</i> spp.,</li> <li>- <i>Streptococcus</i> spp.</li> <li>- <i>Propionibacterium</i> spp.</li> </ul> </li> <li>▪ Bactérias ácido-lácticas:                             <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Bifidobacterium</i> spp.</li> <li>- <i>Lactobacillus</i> spp.</li> <li>- <i>Weissella</i> spp.</li> </ul> </li> <li>▪ Bactérias tipicamente orais:                             <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Prevotella</i> spp.</li> <li>- <i>Veillonella</i> spp.</li> </ul> </li> <li>▪ Bactérias tipicamente cutâneas:                             <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Propionibacterium</i> spp.</li> <li>- <i>Corynebacterium</i> spp.</li> </ul> </li> <li>▪ Leveduras e outros fungos:                             <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Malassezia</i> spp.</li> <li>- <i>Candida</i> spp.</li> <li>- <i>Saccharomyces</i> spp.</li> <li>- <i>Rhodotorula</i> spp.</li> </ul> </li> </ul>

(sIg: imunoglobulina secretora; IL: interleucina; LPS: lipopolissacarídeo; sCD: *cluster* de diferenciação, forma solúvel; TGF: fator de transformação do crescimento)

Tabela VII. Compostos neuroativos detetados na microbiota intestinal. Adaptado com a autorização de Kim *et al.* (2018)<sup>294</sup>

<u>Microbiota intestinal</u>	<u>Neuroquímico</u>
<i>Lactobacillus</i> spp., <i>Bifidobacterium</i> spp.	GABA
<i>Bifidobacterium infantis</i> , <i>Streptococcus</i> spp., <i>Escherichia</i> sp., <i>Enterococcus</i> spp., <i>Lactococcus</i> spp., <i>Lactobacillus</i> spp., <i>Candida</i> spp.	Serotonina
<i>Clostridium sporogenes</i> , <i>Ruminococcus gnavus</i>	Triptamina
<i>Escherichia</i> spp., <i>Bacillus</i> spp., <i>Saccharomyces</i> spp.	Norepinefrina
<i>Escherichia</i> spp., <i>Bacillus</i> spp., <i>Lactococcus</i> spp., <i>Lactobacillus</i> spp., <i>Serratia</i> spp.	Dopamina
<i>Lactobacillus</i> spp., <i>Bacillus</i> spp.	Acetilcolina
<i>Lactococcus</i> spp., <i>Lactobacillus</i> spp., <i>Streptococcus</i> spp., <i>Enterococcus</i> spp.	Histamina
<i>Bacillus</i> sp. JPJ	Levodopa

(GABA: ácido gama-aminobutírico)

*Tabela VIII.* Condições clínicas que potenciam uma colonização intestinal atípica em idade pediátrica. Adaptado com a autorização de Walker (2017)<sup>9</sup>

---

⇒ <b>Fase 1:</b>	<b>Período intrauterino</b> Disbiose no intestino materno (obesidade, uso de antibióticos) pode afetar a passagem transplacentária para o líquido amniótico
⇒ <b>Fase 2:</b>	Colonização inadequada esparsa devido a disbiose materna, parto pré-termo, parto por cesariana ou uso profilático de antibióticos no período perinatal
⇒ <b>Fases 3 e 4:</b>	Introdução à alimentação resulta numa modificação ligeira do processo de colonização
⇒ <b>Fase 4:</b>	Colonização incompleta, com maturação adiada até aos 4-6 anos de idade

---

**Tabela IX.** Disbiose intestinal associada a patologias em idade pediátrica. Adaptado com a autorização de Arrieta *et al.* (2014)<sup>72</sup>

Patologia	Evidência de disbiose	Microrganismos identificados
<b><u>Enterocolite necrosante</u></b> (↓ Firmicutes, ↑ Proteobacteria, ↑ Clostridia)	<ul style="list-style-type: none"> <li>Exposição a antibióticos e alimentação precoce com leite de fórmula são fatores de risco para o desenvolvimento da doença</li> <li>Melhoria dos sintomas pós-administração de probióticos em modelos animais</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Sobrecrescimento de Proteobacteria prévio ao início da ECN</li> </ul>
<b><u>Doença Inflamatória Intestinal</u></b> (↓ Bacteroidetes, ↓ Lachnospiraceae, ↓ Actinobacteria, ↑ Proteobacteria, ↓ Clostridium leptum, ↓ Clostridium coccoides, ↓ Faecalibacterium prausnitzii, ↓ Bifidobacterium spp.)	<ul style="list-style-type: none"> <li>A doença não ocorre em animais <i>germ-free</i></li> <li>A doença verifica-se na presença de determinadas espécies bacterianas em modelos animais geneticamente suscetíveis</li> <li>A microbiota intestinal está perturbada em crianças com a doença</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Diversidade bacteriana reduzida na doença de Crohn, o que não se verifica na colite ulcerosa</li> <li>Níveis de <i>Faecalibacterium prausnitzii</i> aumentados na doença de Crohn, em comparação com indivíduos controlo</li> <li>Incremento de Proteobacteria em doentes com doença de Crohn e colite ulcerosa, com ausência de Verrucomicrobia nestes últimos doentes</li> <li>Doença de Crohn negativamente associada a: <i>Bacteroides</i> spp., <i>Bifidobacterium</i> spp., <i>Blautia</i> spp. e <i>Faecalibacterium prausnitzii</i></li> <li>Doença de Crohn positivamente associada a: <i>Haemophilus</i> sp., Neisseriaceae, <i>Fusobacterium</i> spp., <i>Haemophilus influenzae</i> e <i>Escherichia coli</i></li> <li>Veillonellaceae e Pasteurellaceae especificamente associadas a ulceração profunda na colite ulcerosa</li> </ul>
<b><u>Obesidade</u></b> (↓ <i>Bifidobacterium</i> spp.)	<ul style="list-style-type: none"> <li>A transferência de microbiota de ratinhos obesos para ratinhos <i>germ-free</i> resulta no ganho de peso</li> <li>Antibióticos, incluindo tetraciclina, glicopeptídeos, macrólidos e penicilina, induzem ganho de peso em ensaios com animais</li> <li>Ganho de peso em crianças de 1 a 3 anos quando administração de antibióticos antes dos 6 meses de idade</li> <li>Azitromicina causa ganho de peso em crianças e adolescentes</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Redução de espécies de Bacteroidetes em indivíduos obesos</li> <li>Incremento em <i>Methanobrevibacter smithii</i></li> <li>Incremento em espécies de <i>Lactobacillus</i> spp.</li> <li>Incremento de <i>Faecalibacterium prausnitzii</i> em crianças obesas</li> </ul>
<b><u>Atopia e asma</u></b> (↓ Diversidade, ↓ <i>Bifidobacterium</i> spp., ↓ <i>Lactobacillus</i> spp, ↓ <i>Enterococcus</i> spp., ↑ <i>Escherichia coli</i> , ↑ <i>Clostridium difficile</i> )	<ul style="list-style-type: none"> <li>Ratinhos deficientes no gene TLR4 desenvolvem doença atópica severa</li> <li>Diferenças na microbiota intestinal de crianças com atopia em comparação com controlos saudáveis (a colonização precoce com <i>Lactobacillus</i> spp. associada a uma diminuição da atopia)</li> <li>A administração de vancomicina agravou a asma em ratinhos, o que não se verificou com a estreptomomicina</li> <li>Uma meta-análise englobando 23 estudos concluiu que os bebês nascidos via cesariana têm um aumento de 20% no risco de desenvolver asma durante a infância</li> <li>Melhoria dos sintomas pós-administração de probióticos em modelos animais</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li><i>Mycobacterium vaccae</i> e <i>Helicobacter pylori</i> reduzem, significativamente, as doenças das vias aéreas em ratinhos. Tolerância a <i>H. pylori</i> é mediada por Treg's que suprimem a asma</li> <li>Ratinhos tratados com vancomicina evidenciam uma diminuição de bactérias do género <i>Bacteroides</i> spp. e um incremento nas pertencentes à família Lactobacillaceae</li> <li>As espécies de <i>Clostridium</i> spp. induzem Treg's e resultam em menores títulos de IgE num modelo ratinho com asma</li> </ul>
<b><u>Perturbação do espectro do autismo</u></b> (↑ Bacteroidetes, ↑ Proteobacteria, ↓ Actinobacteria, ↓ Firmicutes)	<ul style="list-style-type: none"> <li>Microbiota alterada, com diversidade aumentada, em crianças doentes, comparando com controlos saudáveis</li> <li>A administração de vancomicina associada a uma melhoria dos sintomas num pequeno grupo de crianças</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>O tratamento de <i>Bacteroides fragilis</i> reduziu os defeitos neurológicos num modelo ratinho com a perturbação</li> </ul>



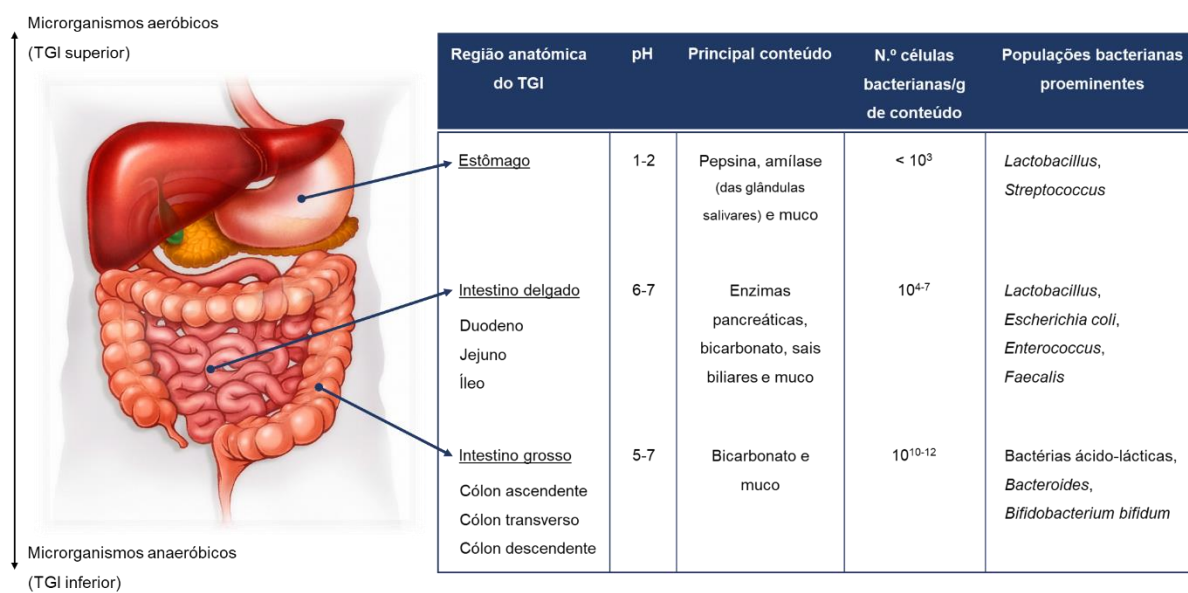
Tabela X. Microbiota intestinal alterada na DII em idade pediátrica. Adaptado com a autorização de Zuo and Ng (2018)<sup>293</sup>

	Diminuição na DII	Incremento na DII
<b><u>Composição microbiana</u></b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Bifidobacterium</i> spp.</li> <li>- <i>Clostridium</i> spp. clusters IV e XIVa</li> <li>- <i>Faecalibacterium prausnitzii</i></li> <li>- <i>Roseburia</i> spp.</li> <li>- <i>Suterella</i> spp.</li> <li>- <i>Bacteroides</i> spp.</li> <li>- <i>Saccharomyces cerevisiae</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Proteobacteria</li> <li>- <i>Escherichia coli</i>, aderente/invasiva</li> <li>- <i>Fusobacterium</i> spp.</li> <li>- <i>Ruminococcus gnavusa</i></li> <li>- Pasteurellaceae</li> <li>- Veillonellaceae</li> <li>- Caudovirales</li> <li>- <i>Clavispora lusitaniae</i></li> <li>- <i>Kluyveromyces marxianus</i></li> <li>- <i>Candida albicans</i></li> <li>- <i>Candida tropicalis</i></li> <li>- <i>Cyberlindnera jadinii</i></li> </ul>
<b><u>Função microbiana</u></b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- AGCC, butirato</li> <li>- Metabolismo do butanoato e propanoato</li> <li>- Biossíntese de aminoácidos</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Auxotrofia</li> <li>- Transporte de aminoácidos</li> <li>- Transporte de sulfato</li> <li>- Stress oxidativo</li> <li>- Sistema de secreção tipo II</li> <li>- Secreção de toxinas</li> </ul>

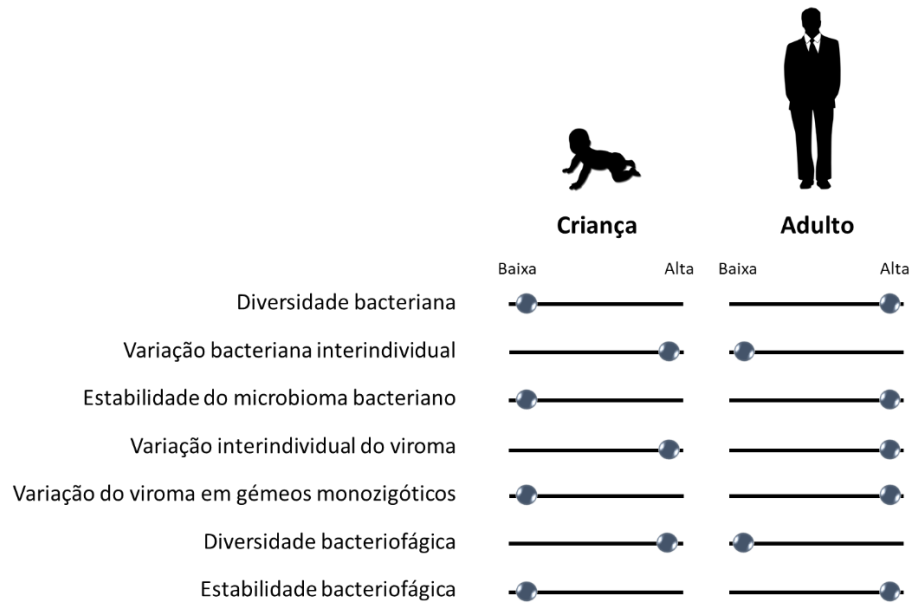
*Tabela XI. Exposições perinatais potenciadoras do desenvolvimento de asma por perturbação da colonização microbiana intestinal. Adaptado com a autorização de Azad and Kozyrskyj (2012)<sup>295</sup>*

Exposição perinatal	Efeito na microbiota intestinal	Efeito no desenvolvimento da asma
<u>Parto por cesariana</u>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Previne a exposição a micróbios fecais maternos</li> <li>- ↓ <i>Bifidobacterium</i> spp. e <i>Bacteroides</i> spp.</li> <li>- ↑ <i>Clostridium difficile</i></li> <li>- As diferenças/alterações podem persistir durante anos</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Aumenta o risco de asma, embora estudos recentes sejam inconsistentes</li> </ul>
<u>Amamentação</u>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Confere uma microbiota intestinal benéfica devido às propriedades prebióticas do leite materno e/ou pela transferência direta de bactérias</li> <li>- ↑ <i>Bifidobacterium</i> spp., ↓ <i>Clostridium difficile</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Protege contra a asma, exceto quando há antecedentes maternos de atopia</li> </ul>
<u>Antibióticos</u>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Suprimem bactérias comensais, permitindo a emergência de <i>Clostridium difficile</i></li> <li>- Distúrbios podem persistir durante anos</li> <li>- Mesmo a exposição indireta é prejudicial</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Aumenta o risco de asma, exceto quando já há antecedentes de atopia nos progenitores</li> <li>- Mesmo a exposição indireta é prejudicial</li> <li>- Alguns estudos podem ser contraditórios</li> </ul>
<u>Probióticos</u>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- A exposição direta ou indireta influencia a composição da microbiota intestinal de uma forma benéfica</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Protege contra a asma em estudos com animais</li> <li>- Testes em humanos são inconclusivos</li> </ul>
<u>Stress perinatal</u>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Provoca mudanças transitórias e, por vezes, duradouras na microbiota intestinal em estudos com animais</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Aumenta o risco de asma</li> </ul>





**Figura 1.** Características do TGI (pH, secreções, populações bacterianas e contagem de células) e localização das populações bacterianas intestinais. Adaptado com a autorização de Prakash *et al.* (2011)<sup>22</sup>



**Figura 2.** Comparação entre o microbioma bacteriano e o viroma intestinal nas idades pediátrica e adulta Adaptado com a autorização de Lim *et al.* (2016)<sup>13</sup>

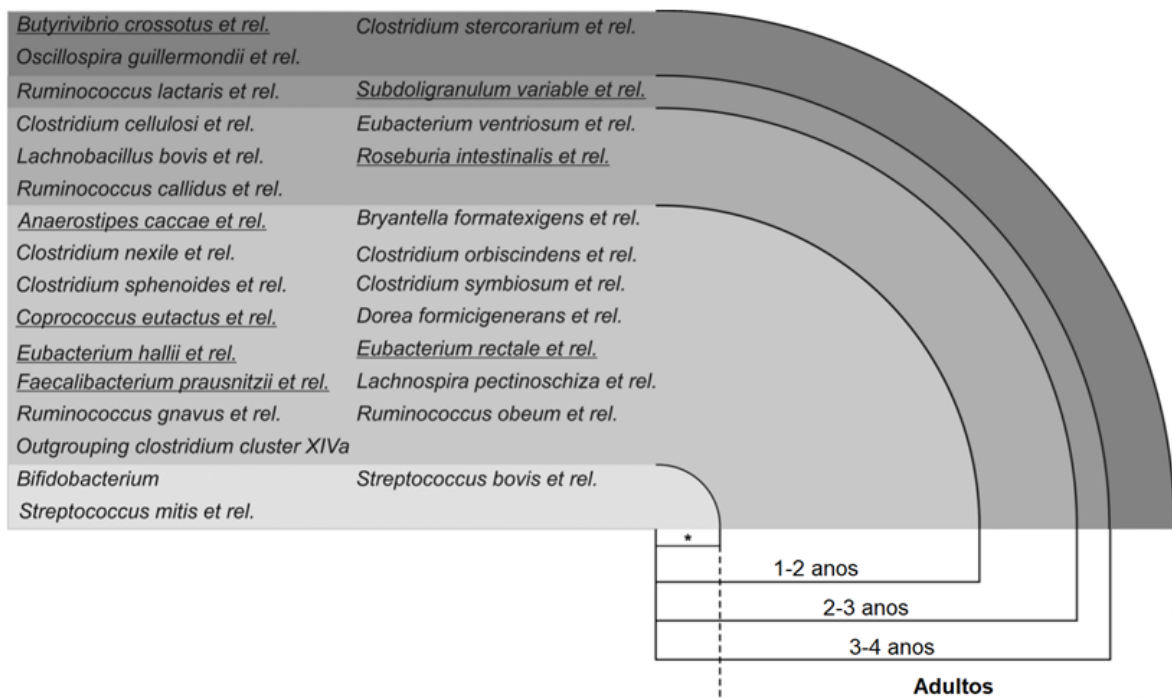
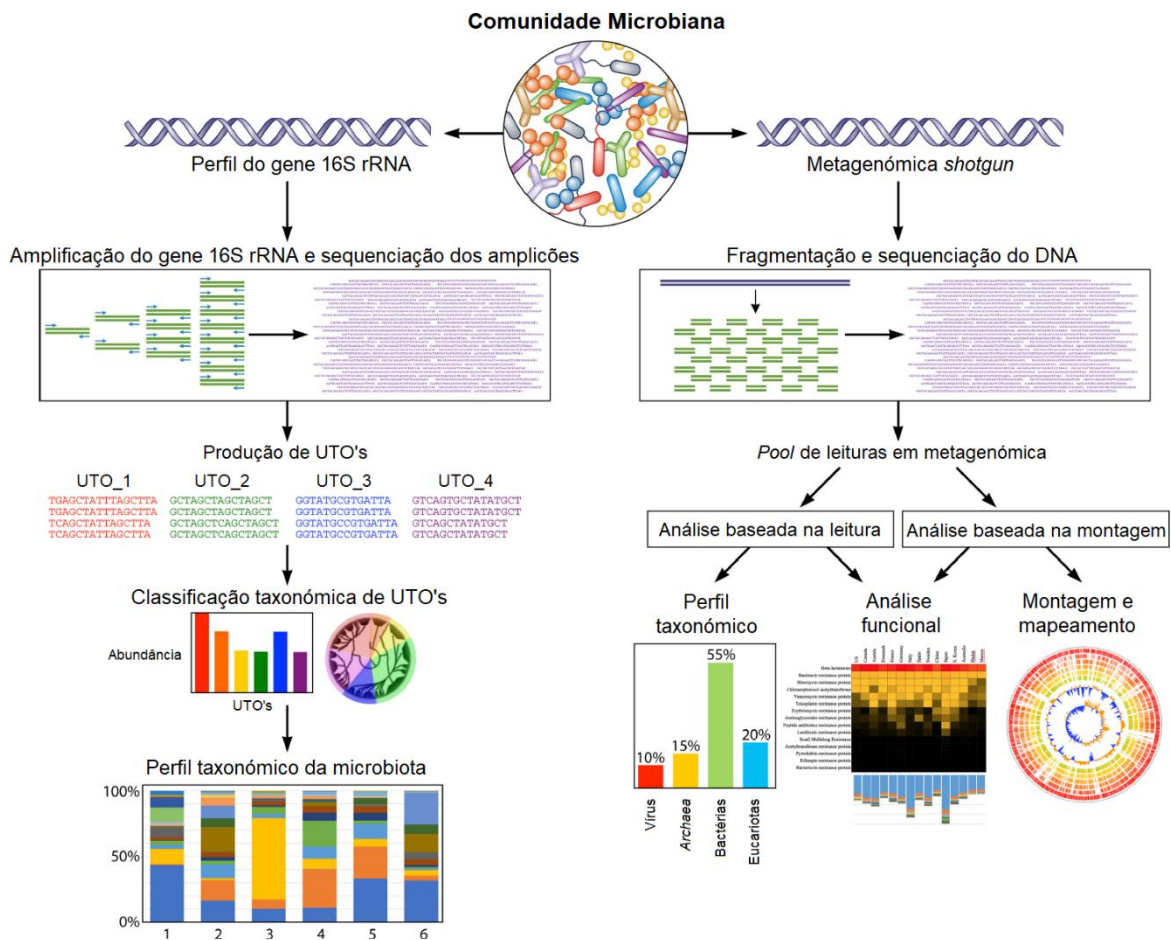


Figura 3. Desenvolvimento do core microbiota intestinal. O asterisco (\*) indica os taxa típicos em idade pediátrica que se encontram reduzidos no core microbiota em idade adulta. A sublinhado estão os taxa de bactérias produtoras de butirato. Adaptado com a autorização de Cheng *et al.* (2015)<sup>101</sup>



**Figura 4.** Visão global das etapas bioinformáticas para obtenção do perfil microbiano do gene 16S rRNA e da metagenômica *shotgun*: a partir da extração de DNA de uma comunidade microbiana e subsequente sequenciação, é gerado o perfil taxonômico da microbiota, com reconstrução de genomas microbianos por correspondente análise funcional gênica. Adaptado com a autorização de Milani *et al.* (2017)<sup>1</sup>

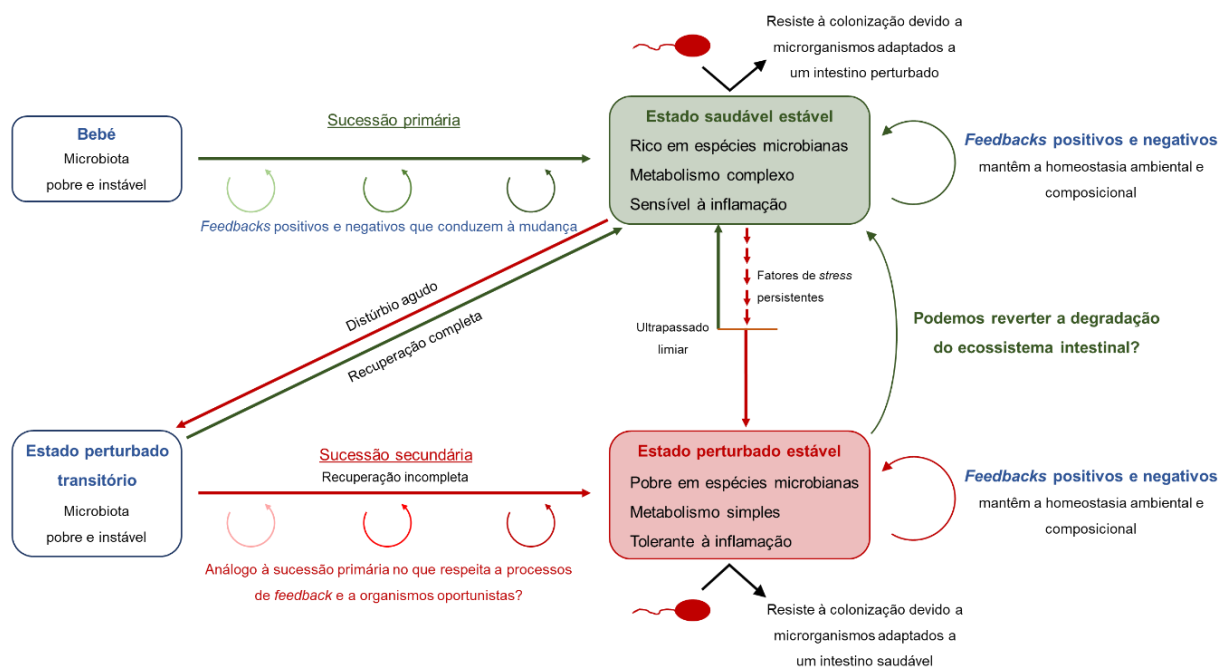
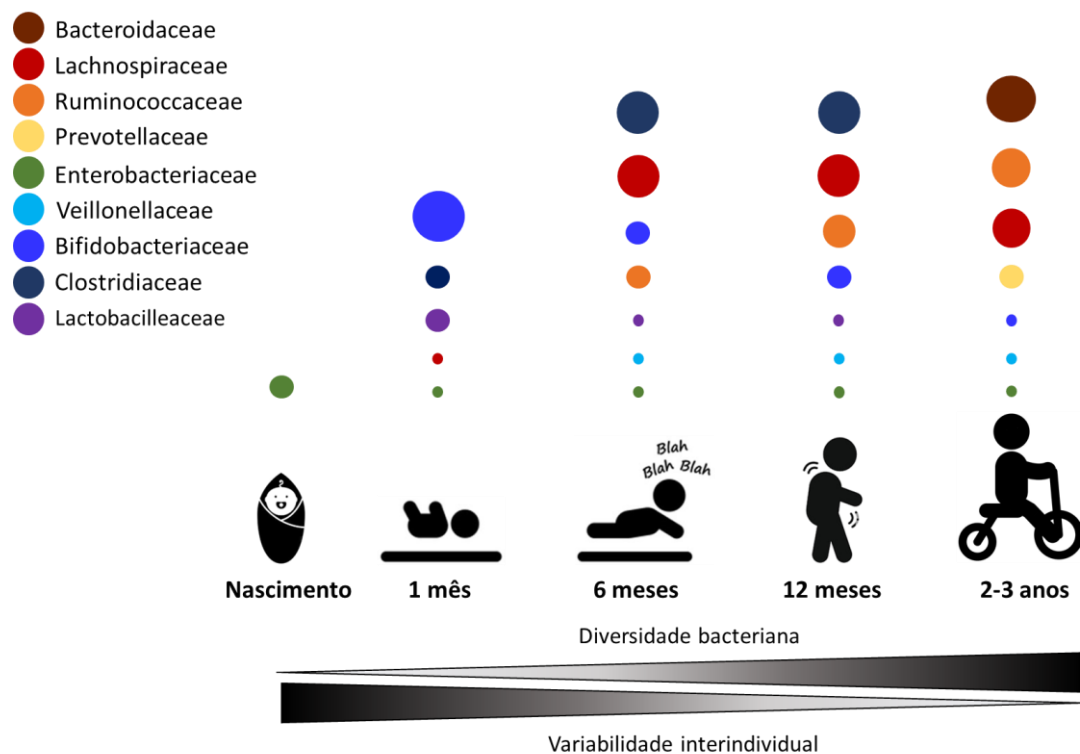


Figura 5. Turnover composicional sistemático na microbiota intestinal humana. Adaptado com a autorização de Lozupone *et al.* (2012)<sup>17</sup>





*Figura 6.* Estádios de colonização microbiana do intestino do neonato e do lactente. As famílias bacterianas mais abundantes são representadas em círculo, cujo o tamanho é proporcional à abundância relativa dos taxa bacterianos em cada fase de crescimento. Adaptado com a autorização de Arrieta *et al.* (2014)<sup>72</sup>

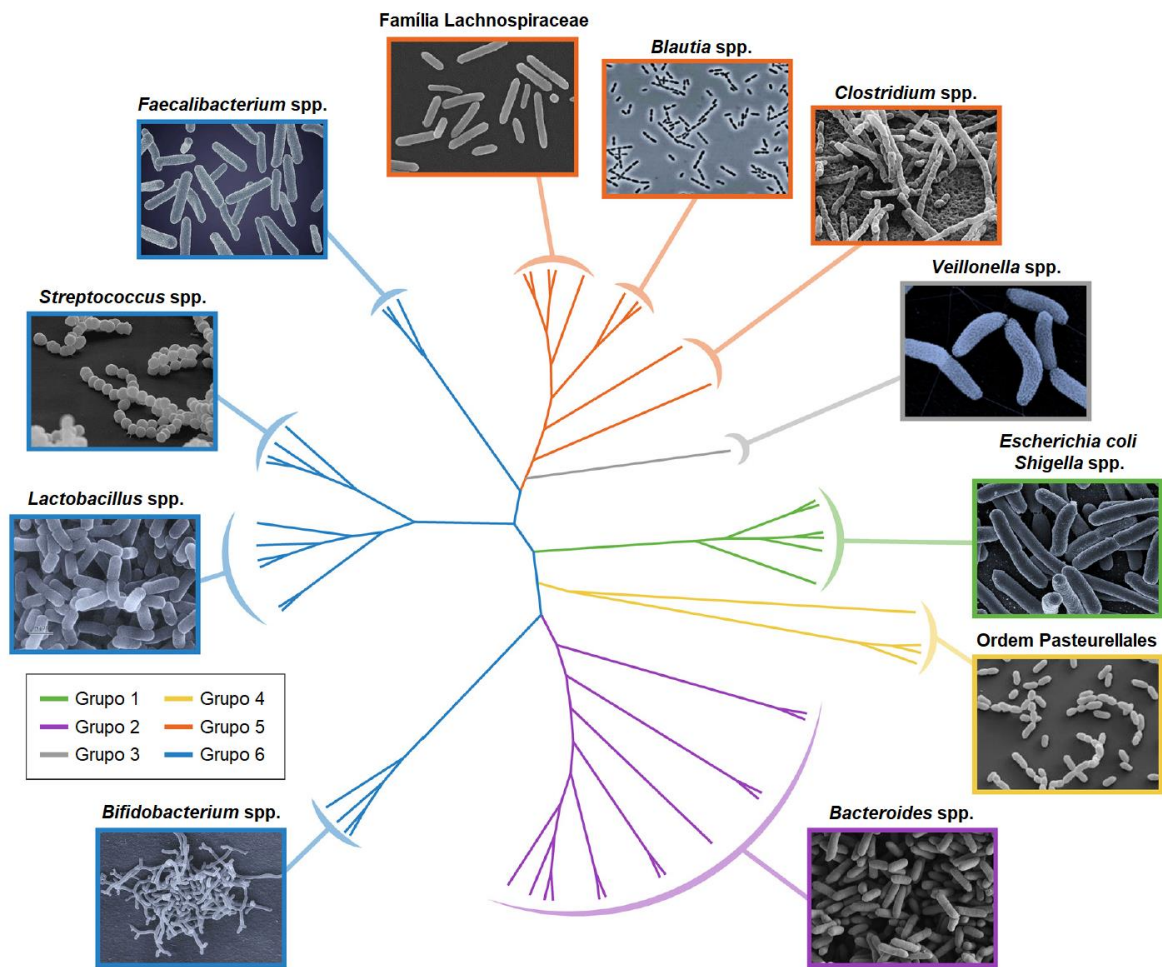


Figura 7. Core microbiota bacteriana do intestino em idade pediátrica. A árvore envolvendo o core foi baseada no gene 16S rRNA. As cores dos ramos indicam os seis principais grupos filogenéticos da microbiota intestinal do lactente. Adaptado com a autorização de Milani *et al.* (2017)<sup>1</sup>

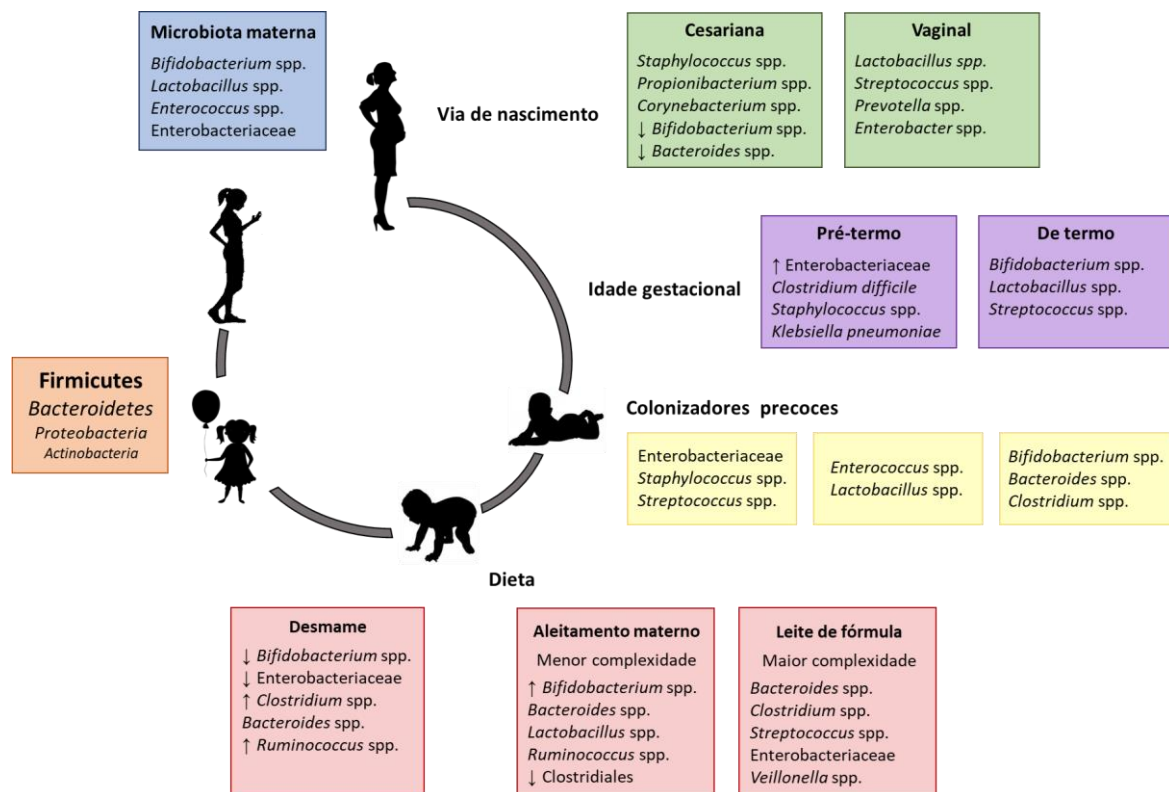
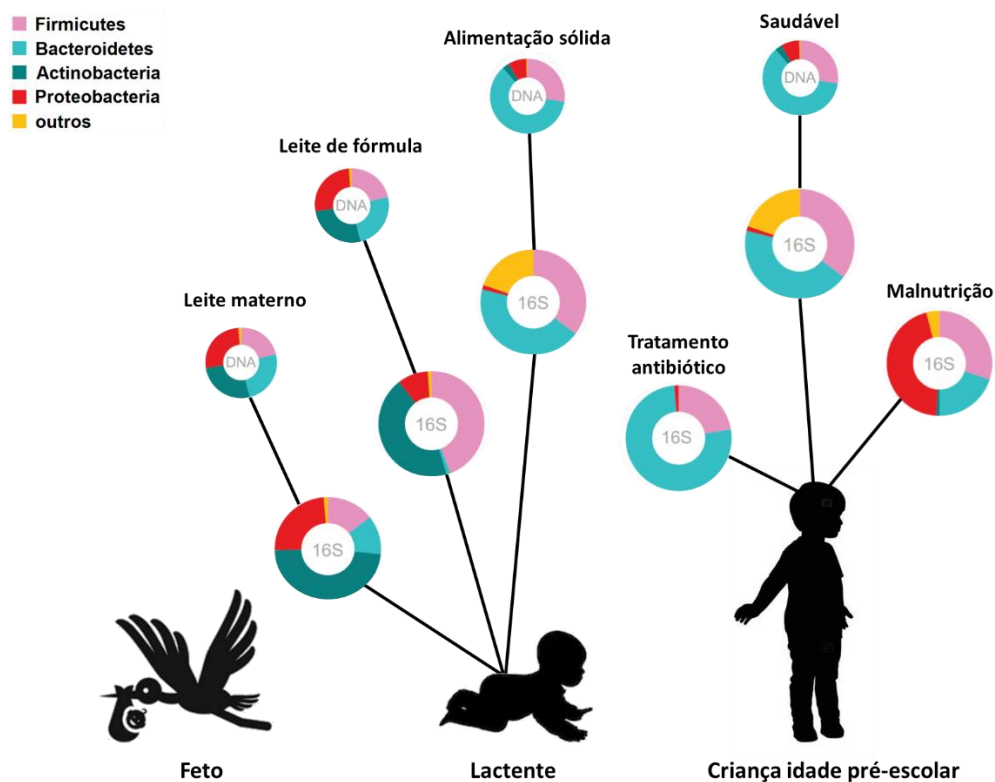
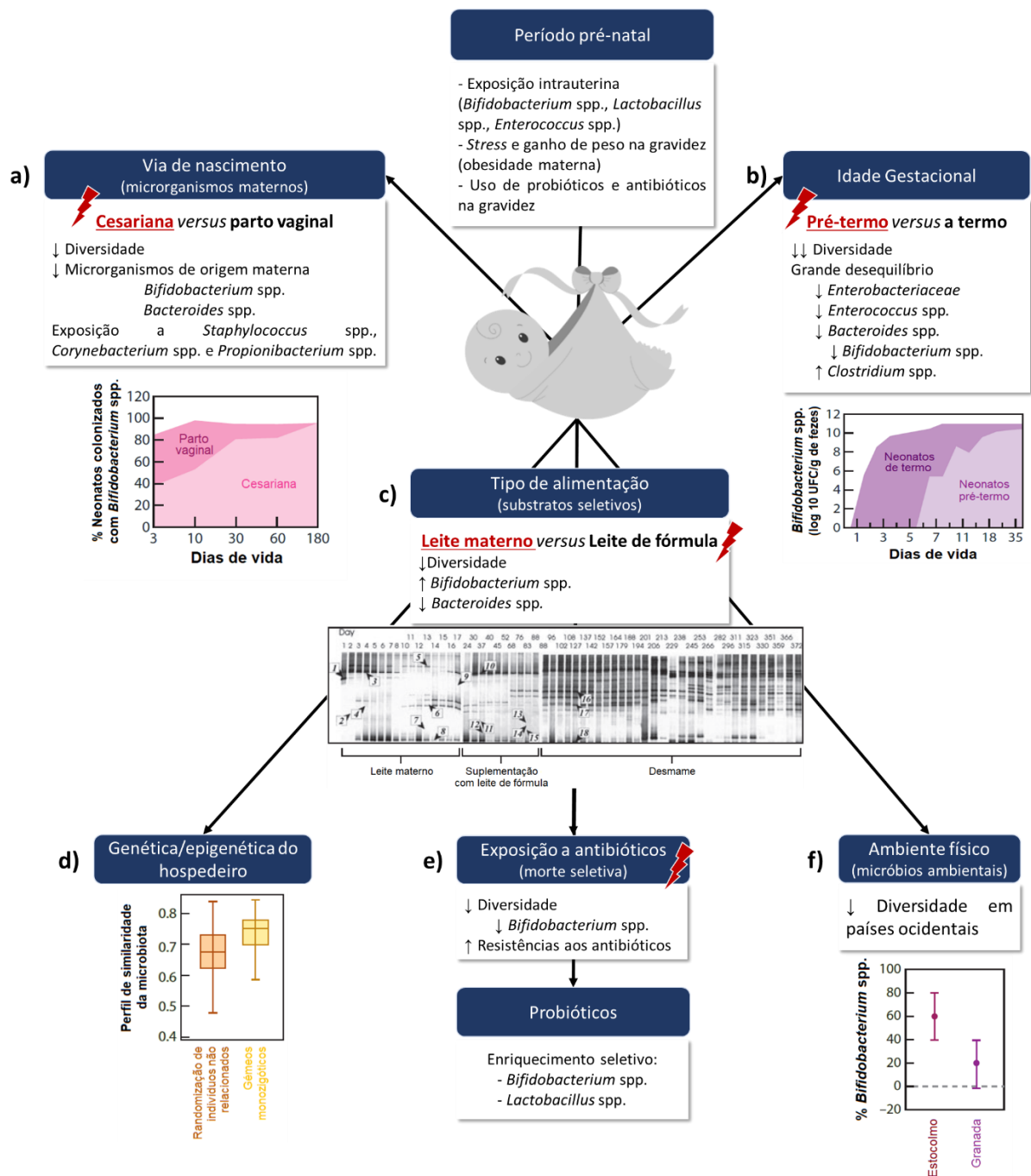


Figura 8. Evolução e expansão da microbiota intestinal precoce e os eventos que influenciam a sua composição. Adaptado com a autorização de Castanys-Muñoz *et al.* (2016)<sup>232</sup>



*Figura 9.* Modelação da microbiota intestinal em idade pediátrica, com ilustração de potenciais perturbações. Os gráficos fornecem uma visão global da abundância relativa dos principais *phyla* da composição da microbiota intestinal, determinada por sequenciação do gene 16S rRNA ou por abordagem metagenómica (DNA). Adaptado com reprodução gráfica autorizada por Ottman *et al.* (2012)<sup>296</sup>



**Figura 10.** Principais fatores determinantes do desenvolvimento da microbiota intestinal em idade pediátrica.<sup>159,160,297,298</sup> (a) (b) Cesariana *versus* parto vaginal e parto pré-termo *versus* parto de termo podem resultar na diminuição da diversidade microbiana e atraso na colonização, particularmente de *Bifidobacterium* spp.; (c) As mudanças dietéticas afetam a diversidade da microbiota intestinal durante o primeiro ano de vida; (d) O contexto genético determina a composição da microbiota intestinal; (e) A exposição a antibióticos está relacionada a uma interrupção na colonização normal, com sobrecrecimento de patógenos; (f) Bactérias do género *Bifidobacterium* spp são mais dominantes nos países nórdicos. Os gráficos apresentados foram reproduzidos e adaptados com a autorização de Scholtens *et al.* (2012)<sup>160</sup>

## Risco aumentado de doença

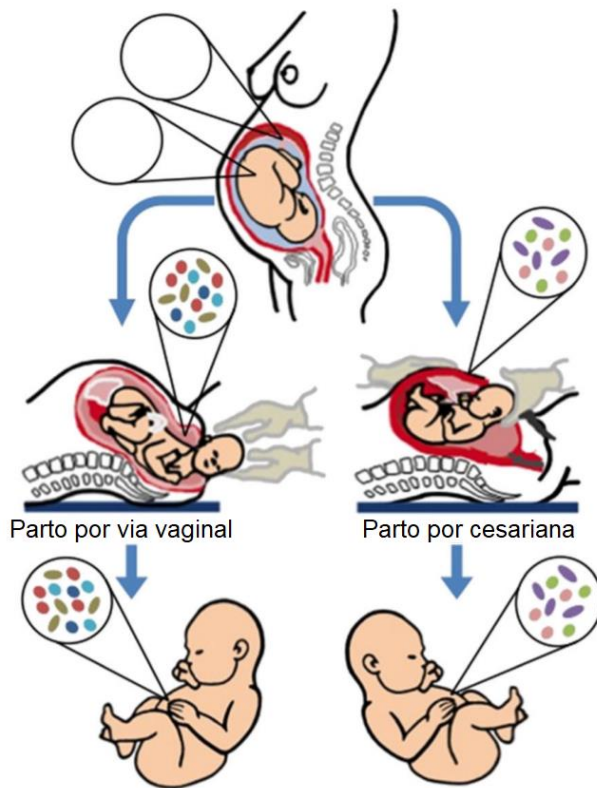


**Figura 11.** Fatores do estilo de vida moderno associados ao desenvolvimento da microbiota intestinal em idade pediátrica, com consequências na saúde futura. Adaptado com a autorização de Nylund *et al.* (2014)<sup>299</sup>



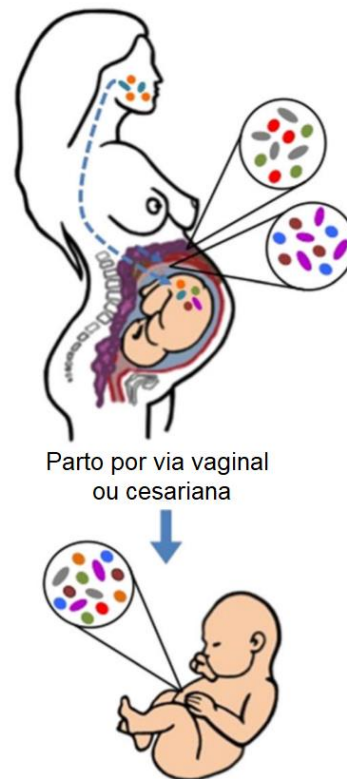
### a) Paradigma do útero estéril

A placenta e o intestino fetal são estéreis.  
O microbioma inicial é adquirido durante e após o nascimento.

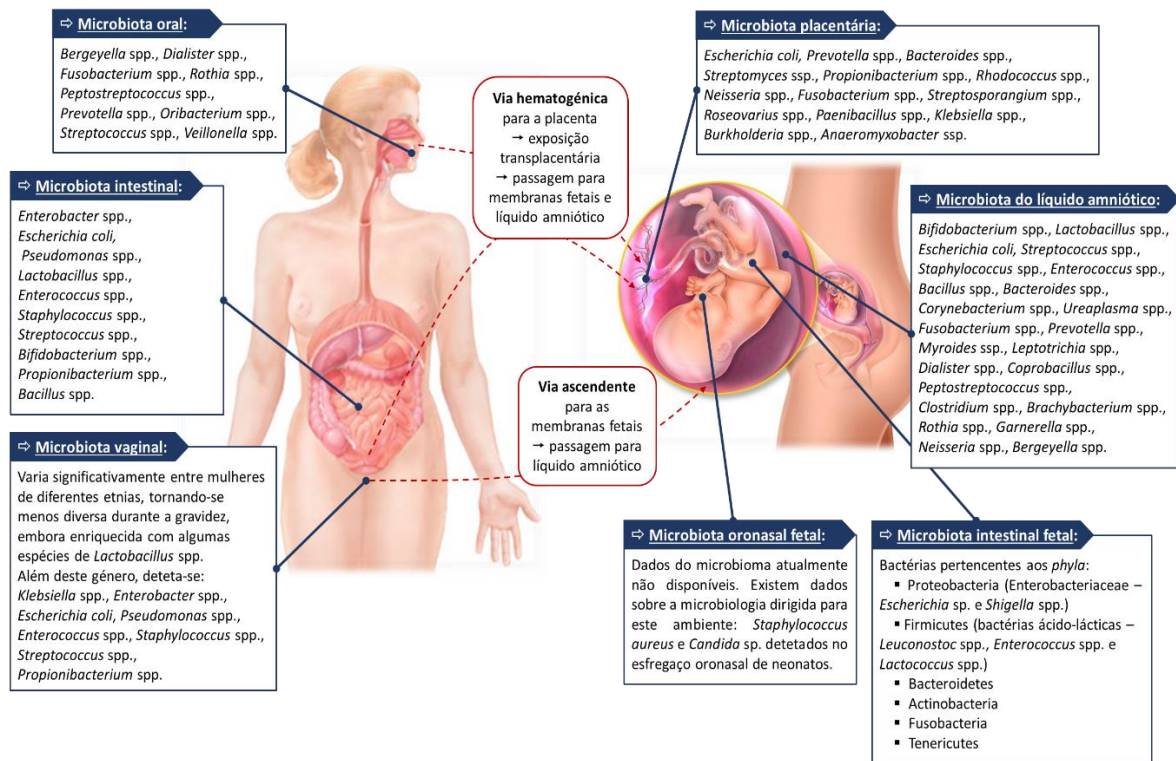


### b) Hipótese da colonização *in* útero

A placenta possui o seu próprio microbioma.  
A colonização do intestino começa *in* útero.

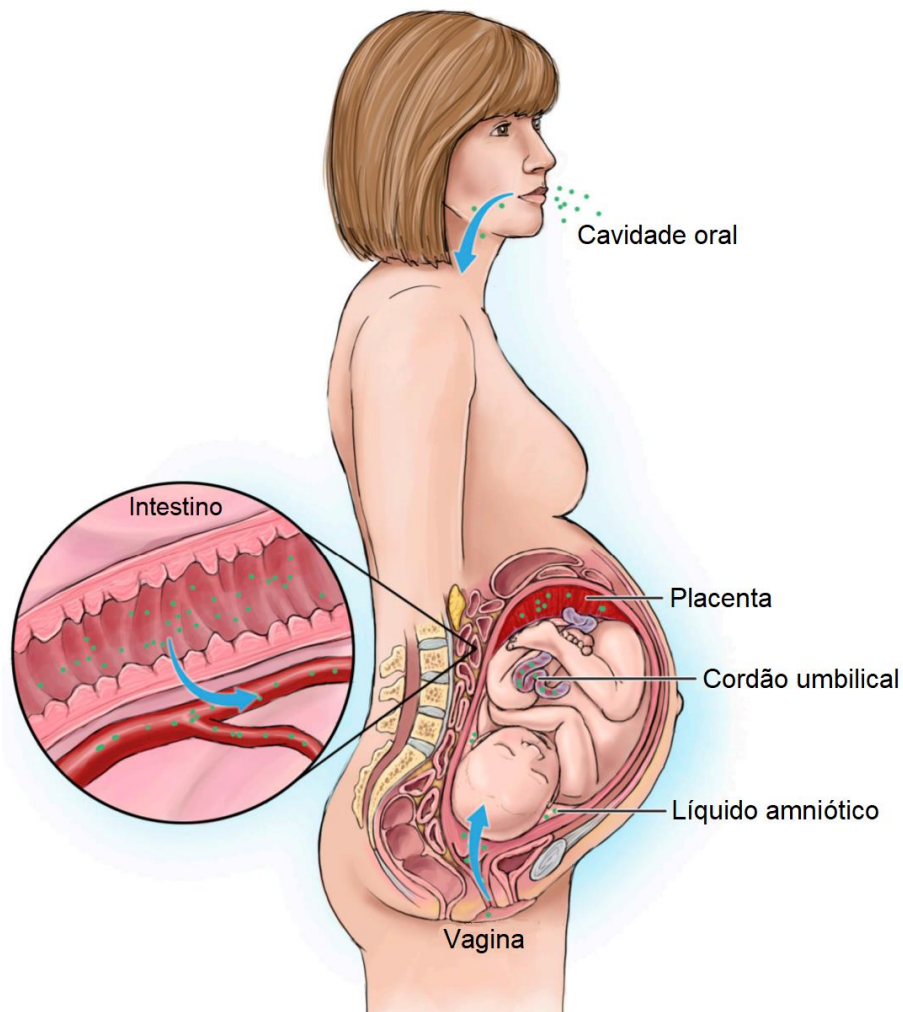


**Figura 12.** Representação esquemática dos conceitos opostos que explicam a aquisição precoce da microbiota intestinal. a) “Paradigma do útero estéril” - a microbiota intestinal dos lactentes nascidos por via vaginal assemelha-se à microbiota do canal vaginal da mãe, enquanto que a microbiota de lactentes nascidos por cesariana é semelhante à microbiota cutânea da mãe. b) “Hipótese da colonização *in* útero” – alguns membros microbianos da microbiota intestinal dos neonatos são adquiridos no período pré-natal, por contacto provável com um microbioma placentário. Adaptado com a autorização de Perez-Muñoz *et al.* (2017)<sup>119</sup>



**Figura 13.** Principais géneros bacterianos em locais maternos, uterinos e fetais, exemplificando possíveis origens para a colonização do intestino fetal. Adaptado com a autorização de Funkhouser and Bordenstein (2013)<sup>300</sup> e Stinson *et al.* (2017)<sup>215</sup>





*Figura 14.* Locais maternos que podem, potencialmente, contribuir para a microbiota intestinal da descendência. Durante a gravidez, a translocação de bactérias dos microbiomas orais e intestinais das mulheres, além da ascensão de bactérias do microbioma vaginal, pode explicar a presença de bactérias não patogênicas em locais intrauterinos, com detecção posterior destas bactérias derivadas da mãe no mecônio neonatal. Adaptado com a autorização de Walker *et al.* (2017)<sup>124</sup>

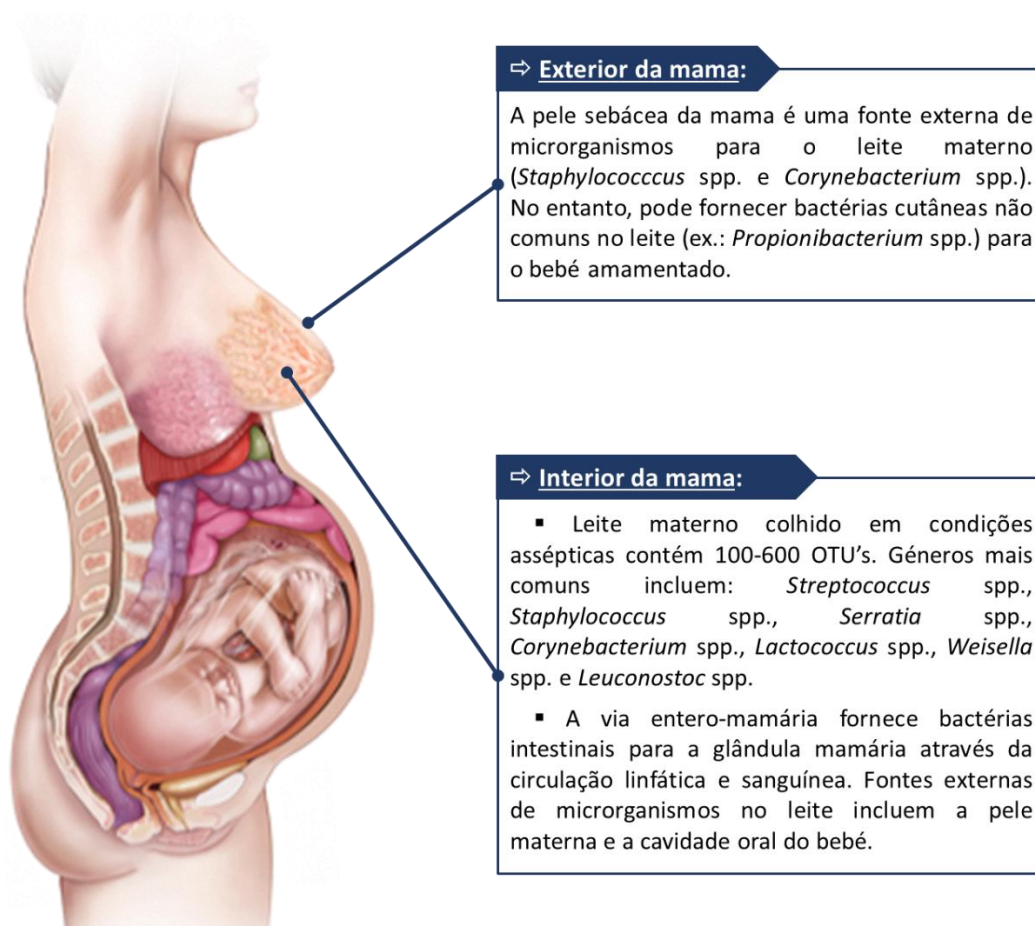


Figura 15. Transmissão de microrganismos ao neonato pelo aleitamento materno (glândula mamária e pele sebácea que envolve a mama). Adaptado com a autorização de Funkhouser and Bordenstein (2013)<sup>300</sup>

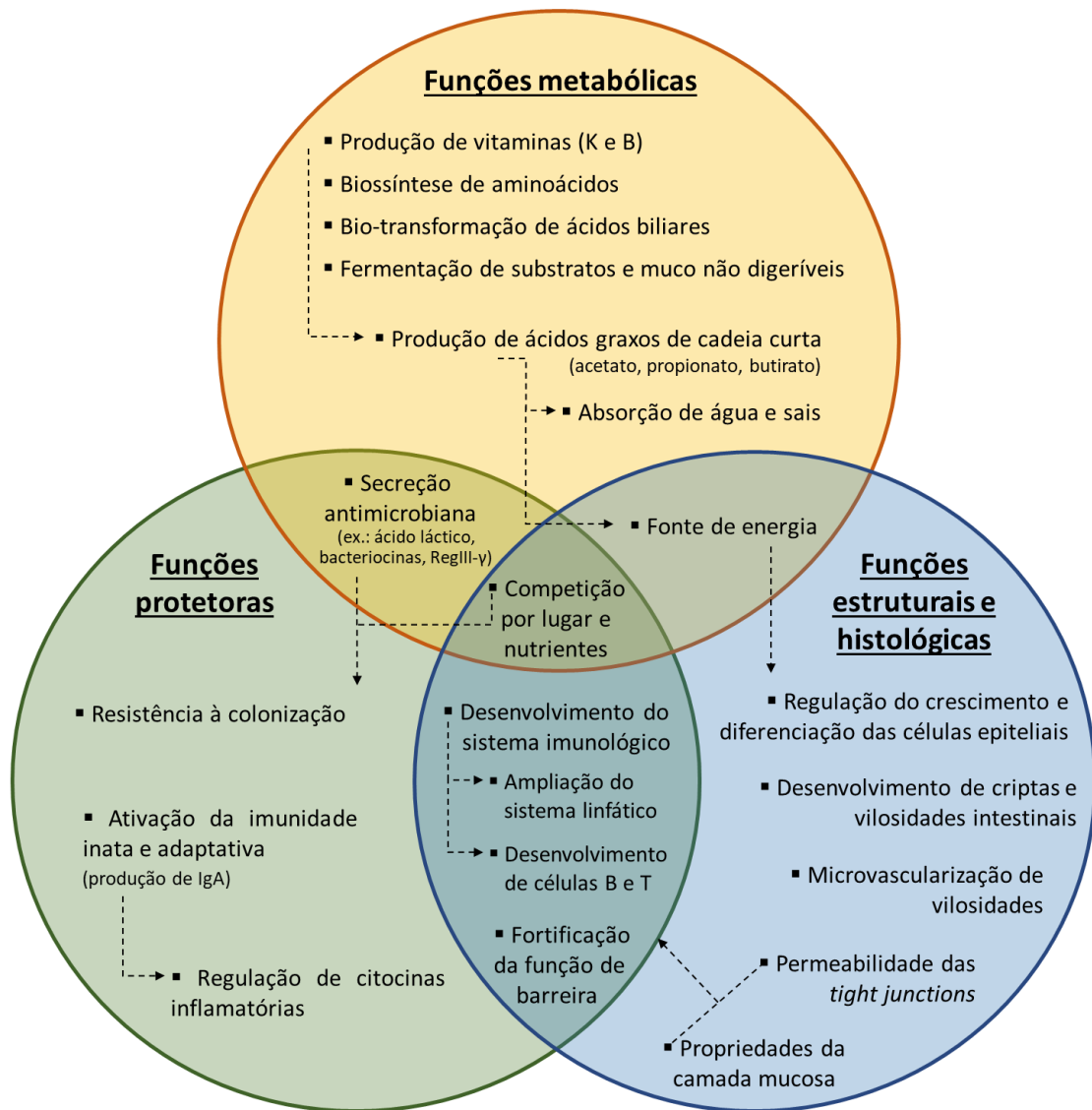


Figura 16. Principais funções benéficas da microbiota intestinal humana. Adaptado com a autorização de Prakash *et al.* (2011)<sup>22</sup>

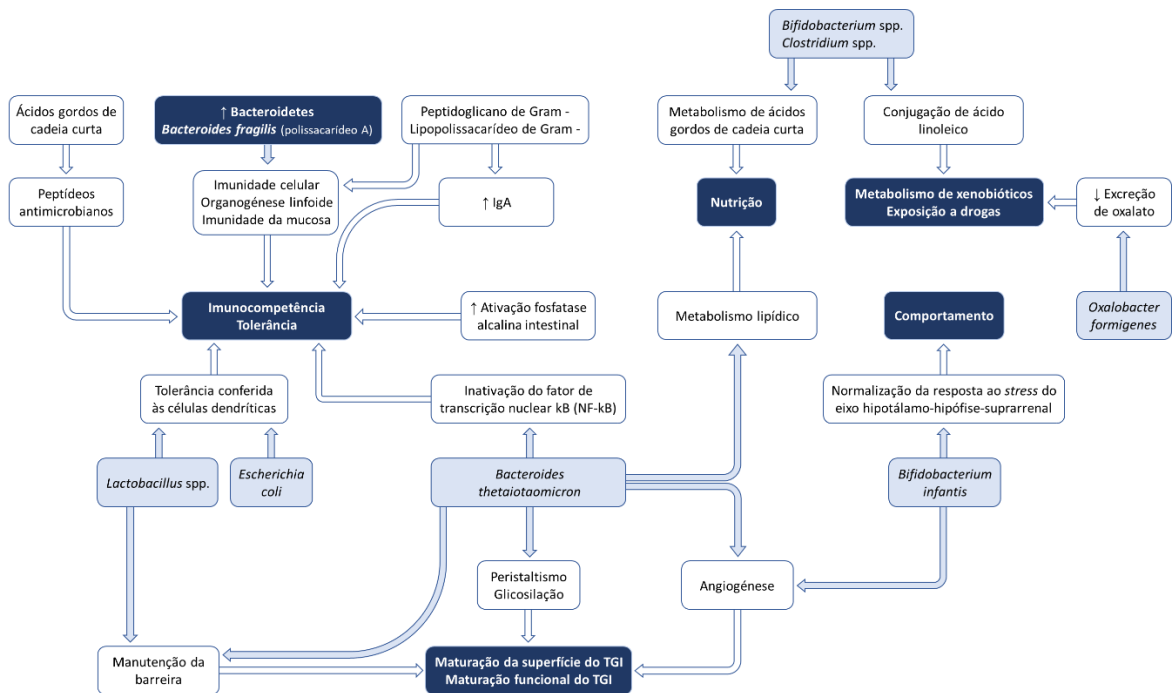
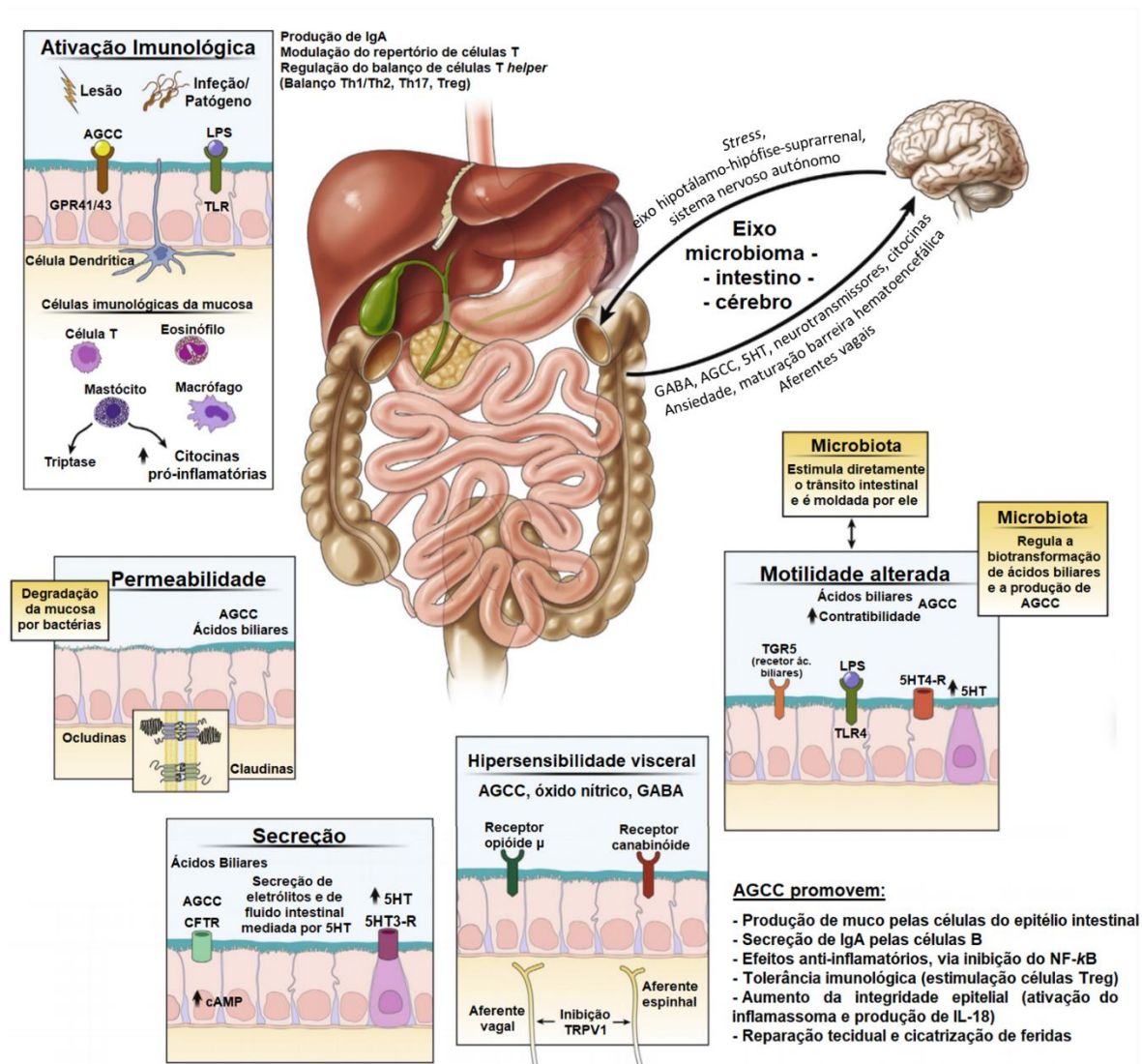
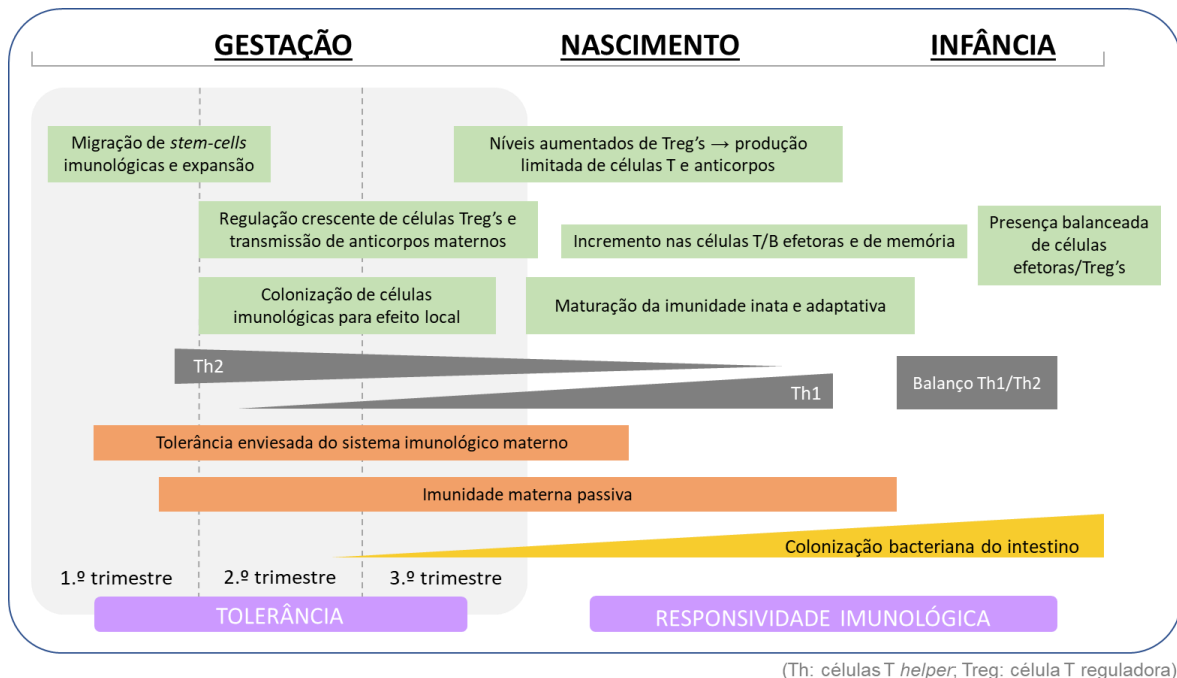


Figura 17. Complexa network de contribuições da microbiota intestinal para a fisiologia do hospedeiro. Adaptado com a autorização de Sekirov *et al.* (2010)<sup>50</sup>



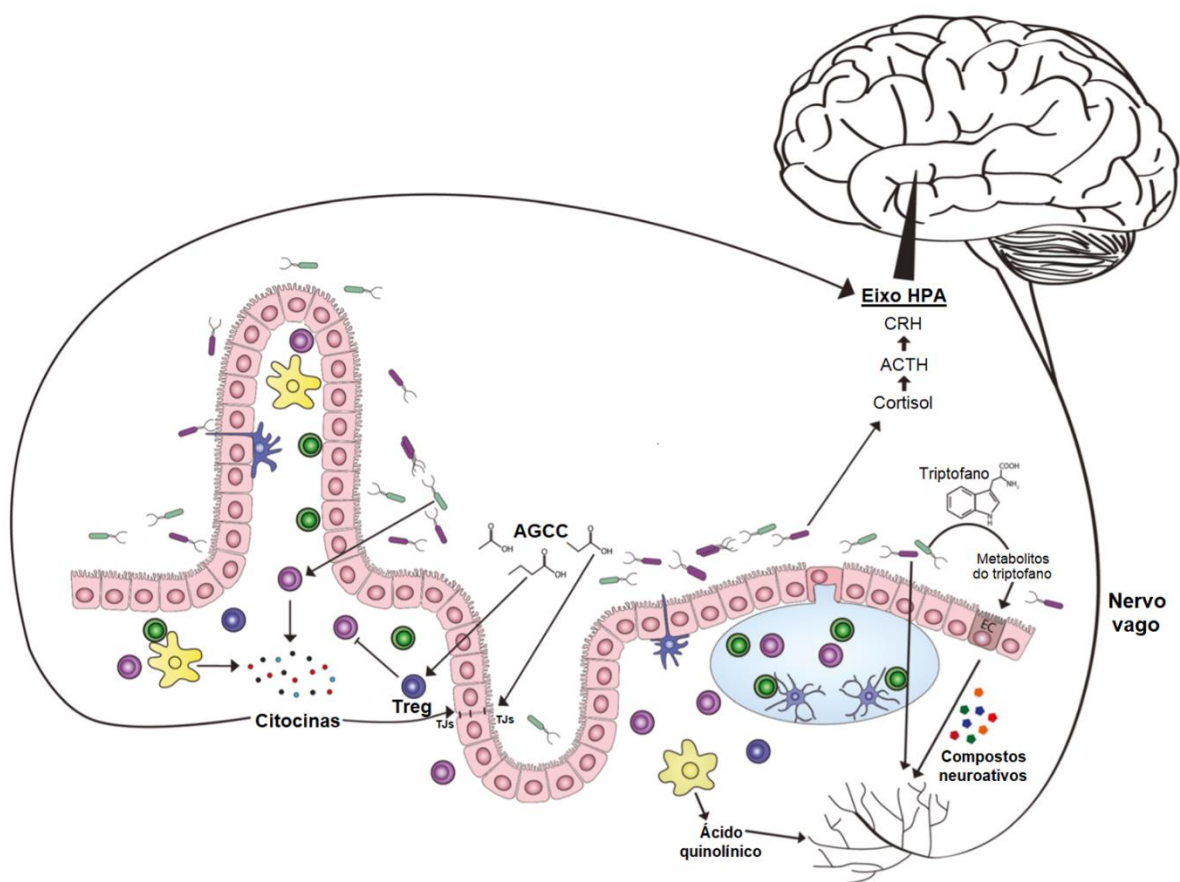
(5HT: 5-hidroxitriptamina; AGCC: ácidos gordos de cadeia curta; cAMP: adenosina monofosfato cíclico; CFTR: regulador de condutância transmembrana em fibrose cística; GABA: ácido  $\gamma$ -aminobutírico; GPR: recetor acoplado à proteína G; Ig: imunoglobulina; IL: interleucina; LPS: lipopolissacarídeo; NF- $\kappa$ B: fator de transcrição nuclear  $\kappa$ B; TLR: recetor do tipo Toll; TGR: recetor de ácidos biliares; Treg: célula T reguladora; TRPV: recetor de potencial transiente vanilóide)

**Figura 18.** Efeitos da microbiota intestinal na fisiologia do hospedeiro. Adaptado com a autorização de Shin *et al.*(2019)<sup>301</sup>



**Figura 19.** Principais eventos que marcam o desenvolvimento do sistema imunológico e do intestino. Durante a gravidez, as células Th do sistema imunológico materno sofrem um desequilíbrio em favor da imunidade do tipo Th2, com o objetivo de manter a tolerância ao feto em desenvolvimento. Assim, a gestante contribui com mediadores tolerog nicos através da placenta (incluindo anticorpos e fatores de crescimento), "instruindo" o desenvolvimento do sistema imunológico fetal. Durante as primeiras semanas e meses de vida, o lactente aumenta, subsequentemente, a atividade Th1, restaurando o equilíbrio das células Th. Se tal mudança não se verificar, a persistência de Th2 pode estar associada a doenças at picas, incluindo a asma. Enquanto as células Th desempenham um papel importante nas respostas imunológicas, principalmente no período neonatal, as células T reguladoras suprimem a ativação e o desenvolvimento de células T na ve a favor dos tipos Th, mantendo a homeostasia da mucosa, quer durante a gravidez, quer no período da infância. Adaptado com a autorização de Dzidic *et al.* (2018)<sup>190</sup>





(ACTH: hormona adrenocorticotrófica; CRH: hormona libertadora de corticotrofina; EC: célula tipo enterocromafim; HPA: hipotálamo-hipófise-suprarrenal; TJ: junções ocludentes ou *tight*)

**Figura 20.** Mecanismos do eixo microbiota-intestino-cérebro. Incluem-se: vias neuroimunes, comunicação neural através do nervo vago, efeito dos metabólitos e dos neurotransmissores derivados da microbiota e a influência desta sobre o metabolismo do triptofano, da quinurenina e da serotonina. Os AGCC podem promover a expansão das células Treg, bem como influenciar as proteínas das junções ocludentes (TJ: *tight junctions*) e a função da barreira intestinal. A microbiota regula os metabólitos do triptofano por três mecanismos: degradação do aminoácido em derivados do indol; utilização das vias da quinurenina e da serotonina; e aumento da expressão da triptofano-hidroxilase 1 nas células enterocromafins. A disbiose pode promover a ativação de células imunológicas, incluindo macrófagos que produzem ácido quinolínico através de uma via da quinurenina alternativa, constituindo esse um agonista do recetor N-metil-D-aspartato (NMDA) excitotóxico. Adicionalmente, as células imunológicas ativadas produzem citocinas pró-inflamatórias que podem perturbar ainda mais a microflora e afetar a função da barreira intestinal. A comunicação neural também pode ocorrer através do nervo vago via sinalização por hormonas e libertação de neurotransmissores pelas células endócrinas do intestino e pelas células imunológicas. Adaptado com a autorização de Hughes *et al.* (2018)<sup>262</sup>

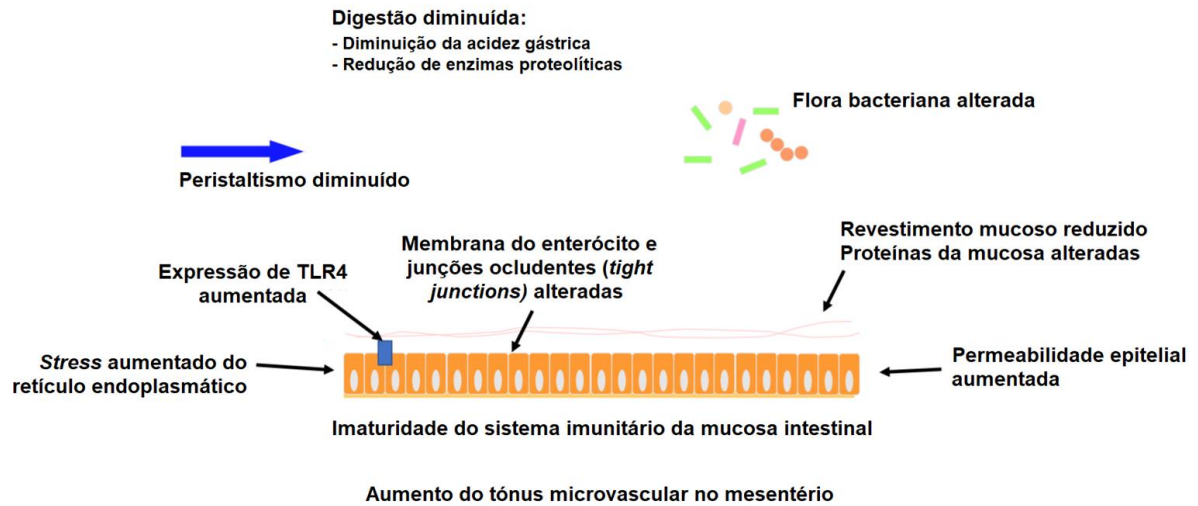
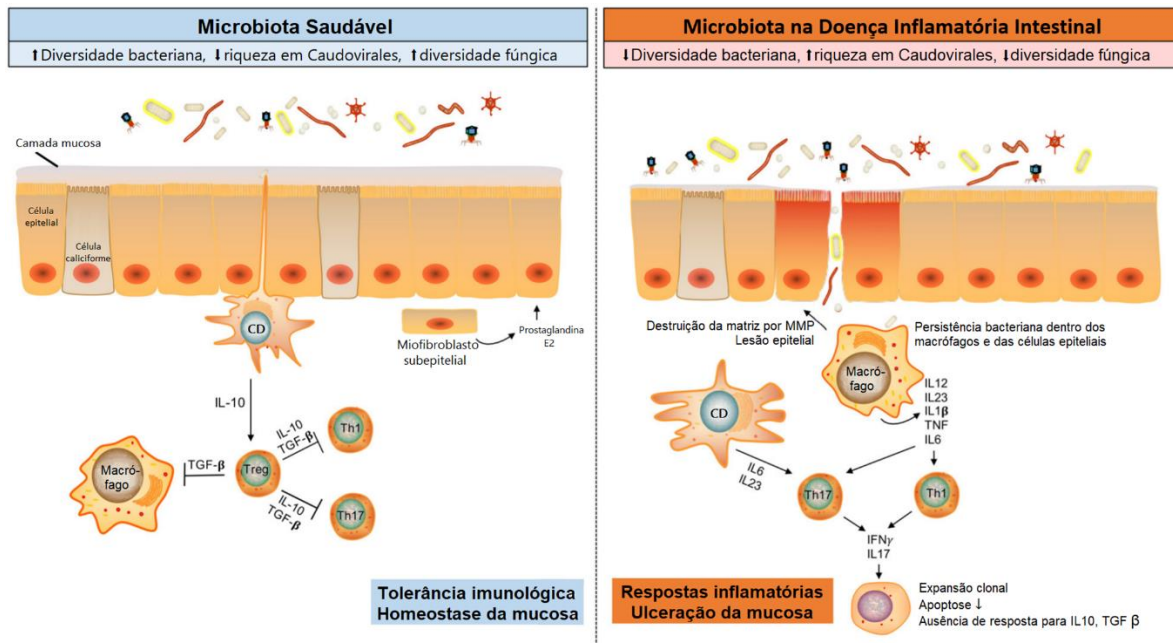


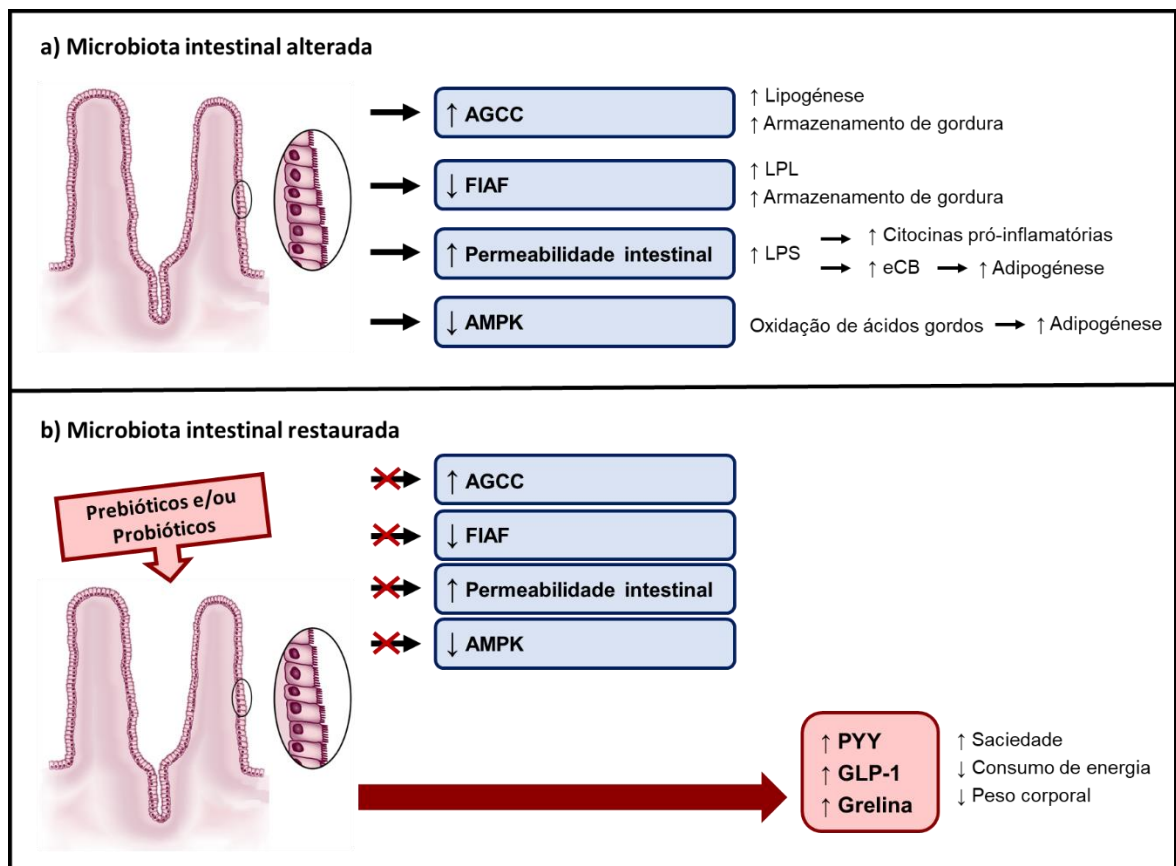
Figura 21. Fatores predisponentes do desenvolvimento de enterocolite necrosante num intestino imaturo. Adaptado com a autorização de Denning and Prince (2018)<sup>302</sup>





(CD: célula dendrítica; IFN: interferão; MMP: metaloproteinase da matriz; TGF: fator de crescimento transformador; TNF: fator de necrose tumoral)

**Figura 22.** Alteração da microbiota intestinal e das respostas imunológicas na DII. Os microrganismos intestinais (bactérias, vírus e fungos) e as respostas imunológicas disfuncionais (envolvendo células Treg's, Th1 e Th17) estão implicados na patogénese da DII. Na homeostasia, os microrganismos intestinais induzem um fenótipo de tolerância imunológica no hospedeiro, enquanto que em condições inflamatórias, como se verifica na DII, antígenos de microrganismos disbióticos ativam células Th1 e Th17, resultando na lesão tecidual, na diminuição da camada mucosa e na penetração com persistência microbiana nos tecidos intestinais. Esta lesão na mucosa acarreta uma maior captação de antígenos microbianos, ligandos TLR e organismos viáveis que perpetuam as respostas imunológicas. Adaptado com a autorização de Zuo and Ng (2018)<sup>293</sup>



(eCB: sistema endocanabinoide; LPL: lipoproteína lipase; LPS: lipopolissacarídeo)

**Figura 23.** Diferentes mecanismos pelos quais a disbiose intestinal pode potenciar à obesidade. a) Um desequilíbrio na microbiota intestinal causa um incremento em AGCC e um aumento permeabilidade do intestino, com diminuição no FIAF (fator adipocitário induzido pelo jejum) e na AMPK (proteína quinase ativada pela adenosina monofosfato); b) Uma microbiota restaurada por prebióticos e/ou probióticos pode inibir os mecanismos descritos em a), ocorrendo um incremento nas hormonas PYY (peptídeo tirosina-tirosina) e GLP-1 (peptídeo-1 similar ao glucagon) e diminuição na grelina. Adaptado com a autorização de Sanchez *et al.* (2014)<sup>303</sup>



## 7. BIBLIOGRAFIA

1. Milani C, Duranti S, Bottacini F, et al. The First Microbial Colonizers of the Human Gut: Composition, Activities, and Health Implications of the Infant Gut Microbiota. *Microbiology and molecular biology reviews* : MMBR 2017;81.
2. Yang I, Corwin EJ, Brennan PA, Jordan S, Murphy JR, Dunlop A. The Infant Microbiome: Implications for Infant Health and Neurocognitive Development. *Nurs Res* 2016;65:76-88.
3. Lepage P. [The human gut microbiota: Interactions with the host and dysfunctions]. *Rev Mal Respir* 2017;34:1085-90.
4. Landman C, Quevrain E. [Gut microbiota: Description, role and pathophysiologic implications]. *Rev Med Interne* 2016;37:418-23.
5. Lu CY, Ni YH. Gut microbiota and the development of pediatric diseases. *J Gastroenterol* 2015;50:720-6.
6. Qin J, Li R, Raes J, et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* 2010;464:59-65.
7. Makino H. Bifidobacterial strains in the intestines of newborns originate from their mothers. *Bioscience of microbiota, food and health* 2018;37:79-85.
8. Gosalbes MJ, Llop S, Valles Y, Moya A, Ballester F, Francino MP. Meconium microbiota types dominated by lactic acid or enteric bacteria are differentially associated with maternal eczema and respiratory problems in infants. *Clin Exp Allergy* 2013;43:198-211.
9. Walker WA. The importance of appropriate initial bacterial colonization of the intestine in newborn, child, and adult health. *Pediatr Res* 2017;82:387-95.
10. Lundell AC, Bjornsson V, Ljung A, et al. Infant B cell memory differentiation and early gut bacterial colonization. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 2012;188:4315-22.
11. Reyes A, Blanton LV, Cao S, et al. Gut DNA viromes of Malawian twins discordant for severe acute malnutrition. 2015;112:11941-6.
12. Lim ES, Zhou Y, Zhao G, et al. Early life dynamics of the human gut virome and bacterial microbiome in infants. *Nature Medicine* 2015;21:1228.
13. Lim ES, Wang D, Holtz LR. The Bacterial Microbiome and Virome Milestones of Infant Development. *Trends in microbiology* 2016;24:801-10.
14. Liu X, Cao S, Zhang X. Modulation of Gut Microbiota-Brain Axis by Probiotics, Prebiotics, and Diet. *J Agric Food Chem* 2015;63:7885-95.
15. Pope JL, Yang Y, Newsome RC, et al. Microbial Colonization Coordinates the Pathogenesis of a *Klebsiella pneumoniae* Infant Isolate. *Sci Rep* 2019;9:3380.
16. Cani PD, Delzenne NM. The role of the gut microbiota in energy metabolism and metabolic disease. *Current pharmaceutical design* 2009;15:1546-58.
17. Lozupone CA, Stombaugh JI, Gordon JI, Jansson JK, Knight R. Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. *Nature* 2012;489:220-30.
18. Ventura M, O'Flaherty S, Claesson MJ, et al. Genome-scale analyses of health-promoting bacteria: probiogenomics. *Nature Reviews Microbiology* 2008;7:61.
19. Barr JJ, Auro R, Furlan M, et al. Bacteriophage adhering to mucus provide a non-host-derived immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2013;110:10771-6.
20. Backhed F, Ley RE, Sonnenburg JL, Peterson DA, Gordon JI. Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science (New York, NY)* 2005;307:1915-20.
21. Ursell LK, Clemente JC, Rideout JR, Gevers D, Caporaso JG, Knight R. The interpersonal and intrapersonal diversity of human-associated microbiota in key body sites. *J Allergy Clin Immunol* 2012;129:1204-8.
22. Prakash S, Tomaro-Duchesneau C, Saha S, Cantor A. The gut microbiota and human health with an emphasis on the use of microencapsulated bacterial cells. *Journal of biomedicine & biotechnology* 2011;2011:981214.

23. Dicksved J, Lindberg M, Rosenquist M, Enroth H, Jansson JK, Engstrand L. Molecular characterization of the stomach microbiota in patients with gastric cancer and in controls. *Journal of medical microbiology* 2009;58:509-16.
24. Willing BP, Dicksved J, Halfvarson J, et al. A pyrosequencing study in twins shows that gastrointestinal microbial profiles vary with inflammatory bowel disease phenotypes. *Gastroenterology* 2010;139:1844-54.e1.
25. Neil JA, Cadwell K. The Intestinal Virome and Immunity. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 2018;201:1615-24.
26. Reyes A, Haynes M, Hanson N, et al. Viruses in the faecal microbiota of monozygotic twins and their mothers. *Nature* 2010;466:334.
27. Columpsi P, Sacchi P, Zuccaro V, et al. Beyond the gut bacterial microbiota: The gut virome. *Journal of medical virology* 2016;88:1467-72.
28. Minot S, Bryson A, Chehoud C, Wu GD, Lewis JD, Bushman FD. Rapid evolution of the human gut virome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2013;110:12450-5.
29. Smith DB, Purdy MA, Simmonds P. Genetic variability and the classification of hepatitis E virus. *Journal of virology* 2013;87:4161-9.
30. Lhomme S, Abravanel F, Dubois M, et al. Hepatitis E virus quasispecies and the outcome of acute hepatitis E in solid-organ transplant patients. *Journal of virology* 2012;86:10006-14.
31. Witso E, Palacios G, Cinek O, et al. High prevalence of human enterovirus a infections in natural circulation of human enteroviruses. *Journal of clinical microbiology* 2006;44:4095-100.
32. Kolehmainen P, Oikarinen S, Koskiniemi M, et al. Human parechoviruses are frequently detected in stool of healthy Finnish children. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology* 2012;54:156-61.
33. Kapusinszky B, Minor P, Delwart E. Nearly Constant Shedding of Diverse Enteric Viruses by Two Healthy Infants. 2012;50:3427-34.
34. Minot S, Sinha R, Chen J, et al. The human gut virome: inter-individual variation and dynamic response to diet. *Genome research* 2011;21:1616-25.
35. Pfeiffer JK, Virgin HW. Viral immunity. *Transkingdom control of viral infection and immunity in the mammalian intestine. Science (New York, NY)* 2016;351.
36. Sansone Christine L, Cohen J, Yasunaga A, et al. Microbiota-Dependent Priming of Antiviral Intestinal Immunity in *Drosophila*. *Cell Host & Microbe* 2015;18:571-81.
37. Kernbauer E, Ding Y, Cadwell K. An enteric virus can replace the beneficial function of commensal bacteria. *Nature* 2014;516:94-8.
38. Kuss SK, Best GT, Etheredge CA, et al. Intestinal Microbiota Promote Enteric Virus Replication and Systemic Pathogenesis. 2011;334:249-52.
39. Uchiyama R, Chassaing B, Zhang B, Gewirtz AT. Antibiotic Treatment Suppresses Rotavirus Infection and Enhances Specific Humoral Immunity. *The Journal of Infectious Diseases* 2014;210:171-82.
40. Lugli GA, Milani C, Turrone F, et al. Prophages of the genus *Bifidobacterium* as modulating agents of the infant gut microbiota. *Environ Microbiol* 2016;18:2196-213.
41. Goodrich JK, Waters JL, Poole AC, et al. Human genetics shape the gut microbiome. *Cell* 2014;159:789-99.
42. Human Microbiome Project C. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature* 2012;486:207-14.
43. Lee S, Sung J, Lee J, Ko G. Comparison of the gut microbiotas of healthy adult twins living in South Korea and the United States. *Applied and environmental microbiology* 2011;77:7433-7.
44. Yatsunenko T, Rey FE, Manary MJ, et al. Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature* 2012;486:222-7.
45. Cotillard A, Kennedy SP, Kong LC, et al. Dietary intervention impact on gut microbial gene richness. *Nature* 2013;500:585-8.

46. Simoes CD, Maukonen J, Kaprio J, Rissanen A, Pietilainen KH, Saarela M. Habitual dietary intake is associated with stool microbiota composition in monozygotic twins. *J Nutr* 2013;143:417-23.
47. Norman Jason M, Handley Scott A, Baldrige Megan T, et al. Disease-Specific Alterations in the Enteric Virome in Inflammatory Bowel Disease. *Cell* 2015;160:447-60.
48. Koppel N, Balskus EP. Exploring and Understanding the Biochemical Diversity of the Human Microbiota. *Cell chemical biology* 2016;23:18-30.
49. Biteen JS, Blainey PC, Cardon ZG, et al. Tools for the Microbiome: Nano and Beyond. *ACS nano* 2016;10:6-37.
50. Sekirov I, Russell SL, Antunes LCM, Finlay BB. Gut Microbiota in Health and Disease. *2010*;90:859-904.
51. Adlerberth I, Wold AE. Establishment of the gut microbiota in Western infants. *Acta paediatrica (Oslo, Norway : 1992)* 2009;98:229-38.
52. Morgan XC, Huttenhower C. Chapter 12: Human microbiome analysis. *PLoS computational biology* 2012;8:e1002808.
53. Peter H, Sommaruga R. An evaluation of methods to study the gut bacterial community composition of freshwater zooplankton. *Journal of Plankton Research* 2008;30:997-1006.
54. Hamady M, Knight R. Microbial community profiling for human microbiome projects: Tools, techniques, and challenges. *Genome research* 2009;19:1141-52.
55. Clarridge JE, 3rd. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clinical microbiology reviews* 2004;17:840-62, table of contents.
56. Chakravorty S, Helb D, Burday M, Connell N, Alland D. A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. *Journal of microbiological methods* 2007;69:330-9.
57. Milani C, Lugli GA, Turroni F, et al. Evaluation of bifidobacterial community composition in the human gut by means of a targeted amplicon sequencing (ITS) protocol. *FEMS Microbiol Ecol* 2014;90:493-503.
58. Hu Y, Yang X, Qin J, et al. Metagenome-wide analysis of antibiotic resistance genes in a large cohort of human gut microbiota. *Nat Commun* 2013;4:2151.
59. Qin J, Li Y, Cai Z, et al. A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. *Nature* 2012;490:55-60.
60. Lugli GA, Milani C, Mancabelli L, et al. Ancient bacteria of the Otzi's microbiome: a genomic tale from the Copper Age. *Microbiome* 2017;5:5.
61. Erickson AR, Cantarel BL, Lamendella R, et al. Integrated metagenomics/metaproteomics reveals human host-microbiota signatures of Crohn's disease. *PloS one* 2012;7:e49138.
62. Feng Q, Liu Z, Zhong S, et al. Integrated metabolomics and metagenomics analysis of plasma and urine identified microbial metabolites associated with coronary heart disease. *Sci Rep* 2016;6:22525.
63. Singh B, Gautam SK, Verma V, Kumar M, Singh B. Metagenomics in animal gastrointestinal ecosystem: Potential biotechnological prospects. *Anaerobe* 2008;14:138-44.
64. Tolonen AC, Xavier RJ. Dissecting the human microbiome with single-cell genomics. *Genome medicine* 2017;9:56.
65. Gill SR, Pop M, Deboy RT, et al. Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science (New York, NY)* 2006;312:1355-9.
66. Vandeputte D, Kathagen G, D'Hoe K, et al. Quantitative microbiome profiling links gut community variation to microbial load. *Nature* 2017;551:507-11.
67. Greub G. Culturomics: a new approach to study the human microbiome. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 2012;18:1157-9.
68. Lagier JC, Khelaifia S, Alou MT, et al. Culture of previously uncultured members of the human gut microbiota by culturomics. *Nature microbiology* 2016;1:16203.

69. Bäckhed F, Roswall J, Peng Y, et al. Dynamics and Stabilization of the Human Gut Microbiome during the First Year of Life. *Cell Host & Microbe* 2015;17:852.
70. Koenig JE, Spor A, Scalfone N, et al. Succession of microbial consortia in the developing infant gut microbiome. 2011;108:4578-85.
71. Vaishampayan PA, Kuehl JV, Froula JL, Morgan JL, Ochman H, Francino MP. Comparative metagenomics and population dynamics of the gut microbiota in mother and infant. *Genome biology and evolution* 2010;2:53-66.
72. Arrieta MC, Stiemsma LT, Amenyogbe N, Brown EM, Finlay B. The intestinal microbiome in early life: health and disease. *Front Immunol* 2014;5:427.
73. Claesson MJ, Cusack S, O'Sullivan O, et al. Composition, variability, and temporal stability of the intestinal microbiota of the elderly. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2011;108 Suppl 1:4586-91.
74. Caporaso JG, Lauber CL, Costello EK, et al. Moving pictures of the human microbiome. *Genome biology* 2011;12:R50.
75. Costello EK, Lauber CL, Hamady M, Fierer N, Gordon JI, Knight R. Bacterial community variation in human body habitats across space and time. *Science (New York, NY)* 2009;326:1694-7.
76. Scanlan PD, Marchesi JR. Micro-eukaryotic diversity of the human distal gut microbiota: qualitative assessment using culture-dependent and -independent analysis of faeces. *Isme j* 2008;2:1183-93.
77. Rautava S, Luoto R, Salminen S, Isolauri E. Microbial contact during pregnancy, intestinal colonization and human disease. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology* 2012;9:565-76.
78. Breitbart M, Haynes M, Kelley S, et al. Viral diversity and dynamics in an infant gut. *Research in microbiology* 2008;159:367-73.
79. Dominguez-Bello MG, Costello EK, Contreras M, et al. Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2010;107:11971-5.
80. Penders J, Thijs C, Vink C, et al. Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. *Pediatrics* 2006;118:511-21.
81. Penders J, Gerhold K, Stobberingh EE, et al. Establishment of the intestinal microbiota and its role for atopic dermatitis in early childhood. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2013;132:601-7.e8.
82. Del Chierico F, Vernocchi P, Petrucca A, et al. Phylogenetic and Metabolic Tracking of Gut Microbiota during Perinatal Development. *PloS one* 2015;10:e0137347.
83. Kramná L, Kolářová K, Oikarinen S, et al. Gut Virome Sequencing in Children With Early Islet Autoimmunity. 2015;38:930-3.
84. Mukhopadhyay I, Segal JP, Carding SR, Hart AL, Hold GL. The gut virome: the 'missing link' between gut bacteria and host immunity? *Therapeutic advances in gastroenterology* 2019;12:1756284819836620.
85. Avershina E, Lundgard K, Sekelja M, et al. Transition from infant- to adult-like gut microbiota. *Environ Microbiol* 2016;18:2226-36.
86. La Rosa PS, Warner BB, Zhou Y, et al. Patterned progression of bacterial populations in the premature infant gut. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2014;111:12522-7.
87. Collado MC, Cernada M, Bauerl C, Vento M, Perez-Martinez G. Microbial ecology and host-microbiota interactions during early life stages. *Gut Microbes* 2012;3:352-65.
88. Jost T, Lacroix C, Braegger CP, Chassard C. New insights in gut microbiota establishment in healthy breast fed neonates. *PloS one* 2012;7:e44595.
89. Jakobsson HE, Abrahamsson TR, Jenmalm MC, et al. Decreased gut microbiota diversity, delayed Bacteroidetes colonisation and reduced Th1 responses in infants delivered by caesarean section. *Gut* 2014;63:559-66.
90. Turrioni F, Peano C, Pass DA, et al. Diversity of bifidobacteria within the infant gut microbiota. *PloS one* 2012;7:e36957.

91. Bergstrom A, Skov TH, Bahl MI, et al. Establishment of intestinal microbiota during early life: a longitudinal, explorative study of a large cohort of Danish infants. *Applied and environmental microbiology* 2014;80:2889-900.
92. Roger LC, Costabile A, Holland DT, Hoyles L, McCartney AL. Examination of faecal Bifidobacterium populations in breast- and formula-fed infants during the first 18 months of life. *Microbiology (Reading, England)* 2010;156:3329-41.
93. Palmer C, Bik EM, DiGiulio DB, Relman DA, Brown PO. Development of the human infant intestinal microbiota. *PLoS biology* 2007;5:e177.
94. Arbolea S, Sanchez B, Milani C, et al. Intestinal microbiota development in preterm neonates and effect of perinatal antibiotics. *The Journal of pediatrics* 2015;166:538-44.
95. Bokulich NA, Chung J, Battaglia T, et al. Antibiotics, birth mode, and diet shape microbiome maturation during early life. *Sci Transl Med* 2016;8:343ra82.
96. Dogra S, Sakwinska O, Soh S-E, et al. Dynamics of Infant Gut Microbiota Are Influenced by Delivery Mode and Gestational Duration and Are Associated with Subsequent Adiposity. 2015;6:e02419-14.
97. Fan W, Huo G, Li X, et al. Diversity of the intestinal microbiota in different patterns of feeding infants by Illumina high-throughput sequencing. *World journal of microbiology & biotechnology* 2013;29:2365-72.
98. Fan W, Huo G, Li X, Yang L, Duan C. Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in infants during the six months of life. *Journal of microbiology and biotechnology* 2014;24:133-43.
99. Yassour M, Vatanen T, Siljander H, et al. Natural history of the infant gut microbiome and impact of antibiotic treatment on bacterial strain diversity and stability. *Sci Transl Med* 2016;8:343ra81.
100. Hill CJ, Lynch DB, Murphy K, et al. Evolution of gut microbiota composition from birth to 24 weeks in the INFANTMET Cohort. *Microbiome* 2017;5:4.
101. Cheng J, Ringel-Kulka T, Heikamp-de Jong I, et al. Discordant temporal development of bacterial phyla and the emergence of core in the fecal microbiota of young children. *The ISME Journal* 2015;10:1002.
102. Cahenzli J, Köller Y, Wyss M, Geuking Markus B, McCoy Kathy D. Intestinal Microbial Diversity during Early-Life Colonization Shapes Long-Term IgE Levels. *Cell Host & Microbe* 2013;14:559-70.
103. Arrieta M-C, Stiemsma LT, Dimitriu PA, et al. Early infancy microbial and metabolic alterations affect risk of childhood asthma. 2015;7:307ra152-307ra152.
104. Russell SL, Gold MJ, Hartmann M, et al. Early life antibiotic-driven changes in microbiota enhance susceptibility to allergic asthma. 2012;13:440-7.
105. Walker WA. Bacterial Colonization of the Newborn Gut, Immune Development, and Prevention of Disease. *Nestle Nutr Inst Workshop Ser* 2017;88:23-33.
106. Nagpal R, Tsuji H, Takahashi T, et al. Sensitive Quantitative Analysis of the Meconium Bacterial Microbiota in Healthy Term Infants Born Vaginally or by Cesarean Section. *Front Microbiol* 2016;7:1997.
107. Dogra S, Sakwinska O, Soh SE, et al. Dynamics of infant gut microbiota are influenced by delivery mode and gestational duration and are associated with subsequent adiposity. *mBio* 2015;6.
108. Praveen P, Jordan F, Priami C, Morine MJ. The role of breast-feeding in infant immune system: a systems perspective on the intestinal microbiome. *Microbiome* 2015;3:41.
109. Lozupone CA, Stombaugh J, Gonzalez A, et al. Meta-analyses of studies of the human microbiota. *Genome research* 2013;23:1704-14.
110. van Nimwegen FA, Penders J, Stobberingh EE, et al. Mode and place of delivery, gastrointestinal microbiota, and their influence on asthma and atopy. *J Allergy Clin Immunol* 2011;128:948-55.e1-3.
111. Harmsen HJ, de Goffau MC. The Human Gut Microbiota. *Adv Exp Med Biol* 2016;902:95-108.
112. Azad MB, Konya T, Maughan H, et al. Infant gut microbiota and the hygiene hypothesis of allergic disease: impact of household pets and siblings on microbiota composition and diversity.



Allergy, asthma, and clinical immunology : official journal of the Canadian Society of Allergy and Clinical Immunology 2013;9:15.

113. Koch MA, Reiner GL, Lugo KA, et al. Maternal IgG and IgA Antibodies Dampen Mucosal T Helper Cell Responses in Early Life. *Cell* 2016;165:827-41.

114. Zeng MY, Cisalpino D, Varadarajan S, et al. Gut Microbiota-Induced Immunoglobulin G Controls Systemic Infection by Symbiotic Bacteria and Pathogens. *Immunity* 2016;44:647-58.

115. Penders J, Thijs C, van den Brandt PA, et al. Gut microbiota composition and development of atopic manifestations in infancy: the KOALA Birth Cohort Study. *Gut* 2007;56:661-7.

116. Aagaard K, Ma J, Antony KM, Ganu R, Petrosino J, Versalovic J. The placenta harbors a unique microbiome. *Sci Transl Med* 2014;6:237ra65.

117. Jimenez E, Marin ML, Martin R, et al. Is meconium from healthy newborns actually sterile? *Research in microbiology* 2008;159:187-93.

118. Karlsson MR, Kahu H, Hanson LA, Telemo E, Dahlgren UI. Neonatal colonization of rats induces immunological tolerance to bacterial antigens. *Eur J Immunol* 1999;29:109-18.

119. Perez-Munoz ME, Arrieta MC, Ramer-Tait AE, Walter J. A critical assessment of the "sterile womb" and "in utero colonization" hypotheses: implications for research on the pioneer infant microbiome. *Microbiome* 2017;5:48.

120. Chong CYL, Bloomfield FH, O'Sullivan JM. Factors Affecting Gastrointestinal Microbiome Development in Neonates. *Nutrients* 2018;10.

121. Wikoff WR, Anfora AT, Liu J, et al. Metabolomics analysis reveals large effects of gut microflora on mammalian blood metabolites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2009;106:3698-703.

122. Collado MC, Rautava S, Aakko J, Isolauri E, Salminen S. Human gut colonisation may be initiated in utero by distinct microbial communities in the placenta and amniotic fluid. *Sci Rep* 2016;6:23129.

123. Zmora N, Zeevi D, Korem T, Segal E, Elinav E. Taking it Personally: Personalized Utilization of the Human Microbiome in Health and Disease. *Cell Host Microbe* 2016;19:12-20.

124. Walker RW, Clemente JC, Peter I, Loos RJF. The prenatal gut microbiome: are we colonized with bacteria in utero? *Pediatr Obes* 2017;12 Suppl 1:3-17.

125. Reid G, Brigidi P, Burton JP, et al. Microbes central to human reproduction. *American journal of reproductive immunology (New York, NY : 1989)* 2015;73:1-11.

126. Verstraelen H, Vilchez-Vargas R, Desimpel F, et al. Characterisation of the human uterine microbiome in non-pregnant women through deep sequencing of the V1-2 region of the 16S rRNA gene. *PeerJ* 2016;4:e1602.

127. Moreno I, Codoner FM, Vilella F, et al. Evidence that the endometrial microbiota has an effect on implantation success or failure. *American journal of obstetrics and gynecology* 2016;215:684-703.

128. Mshvildadze M, Neu J, Shuster J, Theriaque D, Li N, Mai V. Intestinal microbial ecology in premature infants assessed with non-culture-based techniques. *The Journal of pediatrics* 2010;156:20-5.

129. Satokari R, Gronroos T, Laitinen K, Salminen S, Isolauri E. Bifidobacterium and Lactobacillus DNA in the human placenta. *Lett Appl Microbiol* 2009;48:8-12.

130. Queiros da Mota V, Prodhom G, Yan P, Hohlheld P, Greub G, Rouleau C. Correlation between placental bacterial culture results and histological chorioamnionitis: a prospective study on 376 placentas. *Journal of clinical pathology* 2013;66:243-8.

131. Jimenez E, Fernandez L, Marin ML, et al. Isolation of commensal bacteria from umbilical cord blood of healthy neonates born by cesarean section. *Current microbiology* 2005;51:270-4.

132. Aagaard K, Petrosino J, Keitel W, et al. The Human Microbiome Project strategy for comprehensive sampling of the human microbiome and why it matters. *FASEB J* 2013;27:1012-22.

133. Zheng J, Xiao X, Zhang Q, Mao L, Yu M, Xu J. The Placental Microbiome Varies in Association with Low Birth Weight in Full-Term Neonates. *Nutrients* 2015;7:6924-37.

134. Antony KM, Ma J, Mitchell KB, Racusin DA, Versalovic J, Aagaard K. The preterm placental microbiome varies in association with excess maternal gestational weight gain. *American journal of obstetrics and gynecology* 2015;212:653.e1-16.
135. Hansen R, Scott KP, Khan S, et al. First-Pass Meconium Samples from Healthy Term Vaginally-Delivered Neonates: An Analysis of the Microbiota. *PloS one* 2015;10:e0133320.
136. Moles L, Gomez M, Heilig H, et al. Bacterial diversity in meconium of preterm neonates and evolution of their fecal microbiota during the first month of life. *PloS one* 2013;8:e66986.
137. Ardisson AN, de la Cruz DM, Davis-Richardson AG, et al. Meconium microbiome analysis identifies bacteria correlated with premature birth. *PloS one* 2014;9:e90784.
138. Hu J, Nomura Y, Bashir A, et al. Diversified microbiota of meconium is affected by maternal diabetes status. *PloS one* 2013;8:e78257.
139. Gosalbes MJ, Llop S, Vallès Y, Moya A, Ballester F, Francino MP. Meconium microbiota types dominated by lactic acid or enteric bacteria are differentially associated with maternal eczema and respiratory problems in infants. 2013;43:198-211.
140. Dotterud CK, Avershina E, Sekelja M, et al. Does Maternal Perinatal Probiotic Supplementation Alter the Intestinal Microbiota of Mother and Child? *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2015;61:200-7.
141. Koren O, Goodrich JK, Cullender TC, et al. Host remodeling of the gut microbiome and metabolic changes during pregnancy. *Cell* 2012;150:470-80.
142. Collado MC, Isolauri E, Laitinen K, Salminen S. Effect of mother's weight on infant's microbiota acquisition, composition, and activity during early infancy: a prospective follow-up study initiated in early pregnancy. *Am J Clin Nutr* 2010;92:1023-30.
143. Mulligan CM, Friedman JE. Maternal modifiers of the infant gut microbiota: metabolic consequences. *J Endocrinol* 2017;235:R1-r12.
144. Collado MC, Isolauri E, Laitinen K, Salminen S. Distinct composition of gut microbiota during pregnancy in overweight and normal-weight women. *Am J Clin Nutr* 2008;88:894-9.
145. Stanislawski MA, Dabelea D, Wagner BD, Sontag MK, Lozupone CA, Eggesbo M. Pre-pregnancy weight, gestational weight gain, and the gut microbiota of mothers and their infants. *Microbiome* 2017;5:113.
146. Singh SB, Madan J, Coker M, et al. Does birth mode modify associations of maternal pre-pregnancy BMI and gestational weight gain with the infant gut microbiome? *Int J Obes (Lond)* 2019.
147. Penders J, Stobberingh EE, Thijs C, et al. Molecular fingerprinting of the intestinal microbiota of infants in whom atopic eczema was or was not developing. *Clin Exp Allergy* 2006;36:1602-8.
148. Lundgren SN, Madan JC, Emond JA, et al. Maternal diet during pregnancy is related with the infant stool microbiome in a delivery mode-dependent manner. *Microbiome* 2018;6:109.
149. Chu DM, Antony KM, Ma J, et al. The early infant gut microbiome varies in association with a maternal high-fat diet. *Genome medicine* 2016;8:77.
150. Myles IA, Fontecilla NM, Janelins BM, Vithayathil PJ, Segre JA, Datta SK. Parental dietary fat intake alters offspring microbiome and immunity. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 2013;191:3200-9.
151. Zivkovic AM, German JB, Lebrilla CB, Mills DA. Human milk glycobiome and its impact on the infant gastrointestinal microbiota. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2011;108 Suppl 1:4653-8.
152. Benson AK, Kelly SA, Legge R, et al. Individuality in gut microbiota composition is a complex polygenic trait shaped by multiple environmental and host genetic factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2010;107:18933-8.
153. Murphy K, CA OS, Ryan CA, et al. The gut microbiota composition in dichorionic triplet sets suggests a role for host genetic factors. *PloS one* 2015;10:e0122561.
154. Rausch P, Rehman A, Kunzel S, et al. Colonic mucosa-associated microbiota is influenced by an interaction of Crohn disease and FUT2 (Secretor) genotype. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2011;108:19030-5.

155. Totten SM, Zivkovic AM, Wu S, et al. Comprehensive profiles of human milk oligosaccharides yield highly sensitive and specific markers for determining secretor status in lactating mothers. *Journal of proteome research* 2012;11:6124-33.
156. van Best N, Hornef MW, Savelkoul PH, Penders J. On the origin of species: Factors shaping the establishment of infant's gut microbiota. *Birth defects research Part C, Embryo today : reviews* 2015;105:240-51.
157. Frank DN, Robertson CE, Hamm CM, et al. Disease phenotype and genotype are associated with shifts in intestinal-associated microbiota in inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis* 2011;17:179-84.
158. Khachatryan ZA, Ktsoyan ZA, Manukyan GP, Kelly D, Ghazaryan KA, Aminov RI. Predominant role of host genetics in controlling the composition of gut microbiota. *PloS one* 2008;3:e3064.
159. Wang M, Monaco MH, Donovan SM. Impact of early gut microbiota on immune and metabolic development and function. *Semin Fetal Neonatal Med* 2016;21:380-7.
160. Scholtens PA, Oozeer R, Martin R, Amor KB, Knol J. The early settlers: intestinal microbiology in early life. *Annual review of food science and technology* 2012;3:425-47.
161. Forsgren M, Isolauri E, Salminen S, Rautava S. Late preterm birth has direct and indirect effects on infant gut microbiota development during the first six months of life. *Acta paediatrica (Oslo, Norway : 1992)* 2017;106:1103-9.
162. Azad MB, Bridgman SL, Becker AB, Kozyrskyj AL. Infant antibiotic exposure and the development of childhood overweight and central adiposity. *Int J Obes (Lond)* 2014;38:1290-8.
163. Chu S, Yu H, Chen Y, Chen Q, Wang B, Zhang J. Periconceptional and Gestational Exposure to Antibiotics and Childhood Asthma. *PloS one* 2015;10:e0140443.
164. Hviid A, Svanstrom H, Frisch M. Antibiotic use and inflammatory bowel diseases in childhood. *Gut* 2011;60:49-54.
165. Metsala J, Lundqvist A, Virta LJ, Kaila M, Gissler M, Virtanen SM. Mother's and offspring's use of antibiotics and infant allergy to cow's milk. *Epidemiology (Cambridge, Mass)* 2013;24:303-9.
166. Coker MO, Hoen AG, Dade E, et al. Specific class of intrapartum antibiotics relates to maturation of the infant gut microbiota: a prospective cohort study. *Bjog* 2019.
167. Seedat F, Stinton C, Patterson J, et al. Adverse events in women and children who have received intrapartum antibiotic prophylaxis treatment: a systematic review. *BMC pregnancy and childbirth* 2017;17:247.
168. Aloisio I, Quagliarello A, De Fanti S, et al. Evaluation of the effects of intrapartum antibiotic prophylaxis on newborn intestinal microbiota using a sequencing approach targeted to multi hypervariable 16S rDNA regions. *Applied microbiology and biotechnology* 2016;100:5537-46.
169. Stearns JC, Simioni J, Gunn E, et al. Intrapartum antibiotics for GBS prophylaxis alter colonization patterns in the early infant gut microbiome of low risk infants. *Sci Rep* 2017;7:16527.
170. Aloisio I, Mazzola G, Corvaglia LT, et al. Influence of intrapartum antibiotic prophylaxis against group B Streptococcus on the early newborn gut composition and evaluation of the anti-Streptococcus activity of Bifidobacterium strains. *Applied microbiology and biotechnology* 2014;98:6051-60.
171. Azad MB, Konya T, Persaud RR, et al. Impact of maternal intrapartum antibiotics, method of birth and breastfeeding on gut microbiota during the first year of life: a prospective cohort study. *Bjog* 2016;123:983-93.
172. Nogacka A, Salazar N, Suarez M, et al. Impact of intrapartum antimicrobial prophylaxis upon the intestinal microbiota and the prevalence of antibiotic resistance genes in vaginally delivered full-term neonates. *Microbiome* 2017;5:93.
173. Mazzola G, Murphy K, Ross RP, et al. Early Gut Microbiota Perturbations Following Intrapartum Antibiotic Prophylaxis to Prevent Group B Streptococcal Disease. *PloS one* 2016;11:e0157527.
174. Soto A, Martin V, Jimenez E, Mader I, Rodriguez JM, Fernandez L. Lactobacilli and bifidobacteria in human breast milk: influence of antibiotherapy and other host and clinical factors. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2014;59:78-88.

175. Cabrera-Rubio R, Collado MC, Laitinen K, Salminen S, Isolauri E, Mira A. The human milk microbiome changes over lactation and is shaped by maternal weight and mode of delivery. *Am J Clin Nutr* 2012;96:544-51.
176. Corvaglia L, Tonti G, Martini S, et al. Influence of Intrapartum Antibiotic Prophylaxis for Group B Streptococcus on Gut Microbiota in the First Month of Life. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2016;62:304-8.
177. Fouhy F, Guinane CM, Hussey S, et al. High-Throughput Sequencing Reveals the Incomplete, Short-Term Recovery of Infant Gut Microbiota following Parenteral Antibiotic Treatment with Ampicillin and Gentamicin. 2012;56:5811-20.
178. Gaboriau-Routhiau V, Rakotobe S, Lecuyer E, et al. The key role of segmented filamentous bacteria in the coordinated maturation of gut helper T cell responses. *Immunity* 2009;31:677-89.
179. Atarashi K, Nishimura J, Shima T, et al. ATP drives lamina propria T(H)17 cell differentiation. *Nature* 2008;455:808-12.
180. Cho I, Yamanishi S, Cox L, et al. Antibiotics in early life alter the murine colonic microbiome and adiposity. *Nature* 2012;488:621.
181. Vrieze A, Out C, Fuentes S, et al. Impact of oral vancomycin on gut microbiota, bile acid metabolism, and insulin sensitivity. *Journal of Hepatology* 2014;60:824-31.
182. Trasande L, Blustein J, Liu M, Corwin E, Cox LM, Blaser MJ. Infant antibiotic exposures and early-life body mass. *Int J Obes (Lond)* 2013;37:16-23.
183. Ajslev TA, Andersen CS, Gamborg M, Sorensen TI, Jess T. Childhood overweight after establishment of the gut microbiota: the role of delivery mode, pre-pregnancy weight and early administration of antibiotics. *Int J Obes (Lond)* 2011;35:522-9.
184. Korpela K, Salonen A, Virta LJ, et al. Intestinal microbiome is related to lifetime antibiotic use in Finnish pre-school children. *Nat Commun* 2016;7:10410.
185. Mulder B, Pouwels KB, Schuiling-Veninga CC, et al. Antibiotic use during pregnancy and asthma in preschool children: the influence of confounding. *Clin Exp Allergy* 2016;46:1214-26.
186. Clausen TD, Bergholt T, Bouaziz O, et al. Broad-Spectrum Antibiotic Treatment and Subsequent Childhood Type 1 Diabetes: A Nationwide Danish Cohort Study. *PloS one* 2016;11:e0161654.
187. Kronman MP, Zaoutis TE, Haynes K, Feng R, Coffin SE. Antibiotic exposure and IBD development among children: a population-based cohort study. *Pediatrics* 2012;130:e794-803.
188. Brown K, Godovannyi A, Ma C, et al. Prolonged antibiotic treatment induces a diabetogenic intestinal microbiome that accelerates diabetes in NOD mice. *Isme j* 2016;10:321-32.
189. Rousseau C, Levenez F, Fouqueray C, Dore J, Collignon A, Lepage P. Clostridium difficile colonization in early infancy is accompanied by changes in intestinal microbiota composition. *Journal of clinical microbiology* 2011;49:858-65.
190. Dzidic M, Boix-Amoros A, Selma-Royo M, Mira A, Collado MC. Gut Microbiota and Mucosal Immunity in the Neonate. *Med Sci (Basel)* 2018;6.
191. Grasa L, Abecia L, Forcen R, et al. Antibiotic-Induced Depletion of Murine Microbiota Induces Mild Inflammation and Changes in Toll-Like Receptor Patterns and Intestinal Motility. *Microbial ecology* 2015;70:835-48.
192. von Wintersdorff CJ, Wolffs PF, Savelkoul PH, et al. The gut resistome is highly dynamic during the first months of life. *Future microbiology* 2016;11:501-10.
193. Vodovar D, Marcade G, Rousseau H, et al. Predictive factors for extended-spectrum beta-lactamase producing Enterobacteriaceae causing infection among intensive care unit patients with prior colonization. *Infection* 2014;42:743-8.
194. Shoemaker NB, Vlamakis H, Hayes K, Salyers AA. Evidence for extensive resistance gene transfer among Bacteroides spp. and among Bacteroides and other genera in the human colon. *Applied and environmental microbiology* 2001;67:561-8.
195. Rodriguez JM, Murphy K, Stanton C, et al. The composition of the gut microbiota throughout life, with an emphasis on early life. *Microbial ecology in health and disease* 2015;26:26050.
196. Adlerberth I, Strachan DP, Matricardi PM, et al. Gut microbiota and development of atopic eczema in 3 European birth cohorts. *J Allergy Clin Immunol* 2007;120:343-50.

197. Laursen MF, Zachariassen G, Bahl MI, et al. Having older siblings is associated with gut microbiota development during early childhood. *BMC Microbiol* 2015;15:154.
198. Dunne JL, Triplett EW, Gevers D, et al. The intestinal microbiome in type 1 diabetes. *Clinical and experimental immunology* 2014;177:30-7.
199. Penders J, Gerhold K, Thijs C, et al. New insights into the hygiene hypothesis in allergic diseases: mediation of sibling and birth mode effects by the gut microbiota. *Gut Microbes* 2014;5:239-44.
200. Konya T, Koster B, Maughan H, et al. Associations between bacterial communities of house dust and infant gut. *Environmental research* 2014;131:25-30.
201. Brooks B, Firek BA, Miller CS, et al. Microbes in the neonatal intensive care unit resemble those found in the gut of premature infants. *Microbiome* 2014;2:1.
202. Lin A, Bik EM, Costello EK, et al. Distinct distal gut microbiome diversity and composition in healthy children from Bangladesh and the United States. *PloS one* 2013;8:e53838.
203. Grzeskowiak L, Collado MC, Mangani C, et al. Distinct gut microbiota in southeastern African and northern European infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2012;54:812-6.
204. Normand AC, Sudre B, Vacheyrou M, et al. Airborne cultivable microflora and microbial transfer in farm buildings and rural dwellings. *Occupational and environmental medicine* 2011;68:849-55.
205. De Filippo C, Cavalieri D, Di Paola M, et al. Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2010;107:14691-6.
206. Al-Asmakh M, Zadjali F. Use of Germ-Free Animal Models in Microbiota-Related Research. *Journal of microbiology and biotechnology* 2015;25:1583-8.
207. Olszak T, An D, Zeissig S, et al. Microbial exposure during early life has persistent effects on natural killer T cell function. *Science (New York, NY)* 2012;336:489-93.
208. Nishida A, Inoue R, Inatomi O, Bamba S, Naito Y, Andoh A. Gut microbiota in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Clin J Gastroenterol* 2018;11:1-10.
209. Round JL, Mazmanian SK. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nature reviews Immunology* 2009;9:313-23.
210. Cash HL, Whitham CV, Behrendt CL, Hooper LV. Symbiotic bacteria direct expression of an intestinal bactericidal lectin. *Science (New York, NY)* 2006;313:1126-30.
211. Hapfelmeier S, Lawson MA, Slack E, et al. Reversible microbial colonization of germ-free mice reveals the dynamics of IgA immune responses. *Science (New York, NY)* 2010;328:1705-9.
212. El Aidy S, Hooiveld G, Tremaroli V, Backhed F, Kleerebezem M. The gut microbiota and mucosal homeostasis: colonized at birth or at adulthood, does it matter? *Gut Microbes* 2013;4:118-24.
213. Houghteling PD, Walker WA. Why is initial bacterial colonization of the intestine important to infants' and children's health? *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2015;60:294-307.
214. Thorburn AN, Macia L, Mackay CR. Diet, metabolites, and "western-lifestyle" inflammatory diseases. *Immunity* 2014;40:833-42.
215. Stinson LF, Payne MS, Keelan JA. Planting the seed: Origins, composition, and postnatal health significance of the fetal gastrointestinal microbiota. *Crit Rev Microbiol* 2017;43:352-69.
216. Blumer N, Sel S, Virna S, et al. Perinatal maternal application of *Lactobacillus rhamnosus* GG suppresses allergic airway inflammation in mouse offspring. *Clin Exp Allergy* 2007;37:348-57.
217. Martin R, Nauta AJ, Ben Amor K, Knippels LM, Knol J, Garssen J. Early life: gut microbiota and immune development in infancy. *Benef Microbes* 2010;1:367-82.
218. Simon AK, Hollander GA, McMichael A. Evolution of the immune system in humans from infancy to old age. *Proceedings Biological sciences* 2015;282:20143085.
219. Nanthakumar N, Meng D, Goldstein AM, et al. The mechanism of excessive intestinal inflammation in necrotizing enterocolitis: an immature innate immune response. *PloS one* 2011;6:e17776.
220. Elahi S, Ertelt JM, Kinder JM, et al. Immunosuppressive CD71+ erythroid cells compromise neonatal host defence against infection. *Nature* 2013;504:158-62.

221. Abe R, Oda S, Sadahiro T, et al. Gram-negative bacteremia induces greater magnitude of inflammatory response than Gram-positive bacteremia. *Critical care (London, England)* 2010;14:R27.
222. Kant R, de Vos WM, Palva A, Satokari R. Immunostimulatory CpG motifs in the genomes of gut bacteria and their role in human health and disease. *Journal of medical microbiology* 2014;63:293-308.
223. Hansen CH, Nielsen DS, Kverka M, et al. Patterns of early gut colonization shape future immune responses of the host. *PLoS one* 2012;7:e34043.
224. Sudo N, Sawamura S, Tanaka K, Aiba Y, Kubo C, Koga Y. The requirement of intestinal bacterial flora for the development of an IgE production system fully susceptible to oral tolerance induction. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 1997;159:1739-45.
225. Mazmanian SK, Liu CH, Tzianabos AO, Kasper DL. An immunomodulatory molecule of symbiotic bacteria directs maturation of the host immune system. *Cell* 2005;122:107-18.
226. Yu D, Wang D, Zhu FG, et al. Modifications incorporated in CpG motifs of oligodeoxynucleotides lead to antagonist activity of toll-like receptors 7 and 9. *Journal of medicinal chemistry* 2009;52:5108-14.
227. Littman DR, Rudensky AY. Th17 and regulatory T cells in mediating and restraining inflammation. *Cell* 2010;140:845-58.
228. Atarashi K, Tanoue T, Ando M, et al. Th17 Cell Induction by Adhesion of Microbes to Intestinal Epithelial Cells. *Cell* 2015;163:367-80.
229. Round JL, Lee SM, Li J, et al. The Toll-like receptor 2 pathway establishes colonization by a commensal of the human microbiota. *Science (New York, NY)* 2011;332:974-7.
230. Chichlowski M, De Lartigue G, German JB, Raybould HE, Mills DA. Bifidobacteria isolated from infants and cultured on human milk oligosaccharides affect intestinal epithelial function. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2012;55:321-7.
231. Frank DN, St Amand AL, Feldman RA, Boedeker EC, Harpaz N, Pace NR. Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2007;104:13780-5.
232. Castanys-Munoz E, Martin MJ, Vazquez E. Building a Beneficial Microbiome from Birth. *Adv Nutr* 2016;7:323-30.
233. Marchesi JR, Adams DH, Fava F, et al. The gut microbiota and host health: a new clinical frontier. *Gut* 2016;65:330-9.
234. Wong JM, de Souza R, Kendall CW, Emam A, Jenkins DJ. Colonic health: fermentation and short chain fatty acids. *J Clin Gastroenterol* 2006;40:235-43.
235. Arpaia N, Campbell C, Fan X, et al. Metabolites produced by commensal bacteria promote peripheral regulatory T-cell generation. *Nature* 2013;504:451-5.
236. Fukuda S, Toh H, Hase K, et al. Bifidobacteria can protect from enteropathogenic infection through production of acetate. *Nature* 2011;469:543-7.
237. Furusawa Y, Obata Y, Fukuda S, et al. Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. *Nature* 2013;504:446-50.
238. Machiels K, Joossens M, Sabino J, et al. A decrease of the butyrate-producing species *Roseburia hominis* and *Faecalibacterium prausnitzii* defines dysbiosis in patients with ulcerative colitis. *Gut* 2014;63:1275-83.
239. De Vadder F, Kovatcheva-Datchary P, Goncalves D, et al. Microbiota-generated metabolites promote metabolic benefits via gut-brain neural circuits. *Cell* 2014;156:84-96.
240. Trompette A, Gollwitzer ES, Yadava K, et al. Gut microbiota metabolism of dietary fiber influences allergic airway disease and hematopoiesis. *Nature Medicine* 2014;20:159.
241. Schwarzer M, Makki K, Storelli G, et al. *Lactobacillus plantarum* strain maintains growth of infant mice during chronic undernutrition. *Science (New York, NY)* 2016;351:854-7.
242. Brown EM, Wlodarska M, Willing BP, et al. Diet and specific microbial exposure trigger features of environmental enteropathy in a novel murine model. *Nat Commun* 2015;6:7806.

243. Nobel YR, Cox LM, Kirigin FF, et al. Metabolic and metagenomic outcomes from early-life pulsed antibiotic treatment. *Nat Commun* 2015;6:7486.
244. Blanton LV, Charbonneau MR, Salih T, et al. Gut bacteria that prevent growth impairments transmitted by microbiota from malnourished children. *Science (New York, NY)* 2016;351.
245. Reynolds CM, Perry JK, Vickers MH. Manipulation of the Growth Hormone-Insulin-Like Growth Factor (GH-IGF) Axis: A Treatment Strategy to Reverse the Effects of Early Life Developmental Programming. *International journal of molecular sciences* 2017;18:1729.
246. Schwarzer M. Gut microbiota: puppeteer of the host juvenile growth. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2018;21:179-83.
247. Gough EK, Moodie EE, Prendergast AJ, et al. The impact of antibiotics on growth in children in low and middle income countries: systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. *BMJ (Clinical research ed)* 2014;348:g2267.
248. Onubi OJ, Poobalan AS, Dineen B, Marais D, McNeill G. Effects of probiotics on child growth: a systematic review. *Journal of health, population, and nutrition* 2015;34:8.
249. Tidjani Alou M, Million M, Traore SI, et al. Gut Bacteria Missing in Severe Acute Malnutrition, Can We Identify Potential Probiotics by Culturomics? *Front Microbiol* 2017;8:899.
250. Backhed F, Roswall J, Peng Y, et al. Dynamics and Stabilization of the Human Gut Microbiome during the First Year of Life. *Cell Host Microbe* 2015;17:690-703.
251. Mack DR, Michail S, Wei S, McDougall L, Hollingsworth MA. Probiotics inhibit enteropathogenic *E. coli* adherence in vitro by inducing intestinal mucin gene expression. *The American journal of physiology* 1999;276:G941-50.
252. Kamada N, Kim YG, Sham HP, et al. Regulated virulence controls the ability of a pathogen to compete with the gut microbiota. *Science (New York, NY)* 2012;336:1325-9.
253. Huang T, Zhang X, Pan J, Su X, Jin X, Guan X. Purification and Characterization of a Novel Cold Shock Protein-Like Bacteriocin Synthesized by *Bacillus thuringiensis*. *Sci Rep* 2016;6:35560.
254. Kinnebrew MA, Ubeda C, Zenewicz LA, Smith N, Flavell RA, Pamer EG. Bacterial flagellin stimulates Toll-like receptor 5-dependent defense against vancomycin-resistant *Enterococcus* infection. *J Infect Dis* 2010;201:534-43.
255. Ivanov, II, Atarashi K, Manel N, et al. Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria. *Cell* 2009;139:485-98.
256. Hooper LV, Wong MH, Thelin A, Hansson L, Falk PG, Gordon JI. Molecular analysis of commensal host-microbial relationships in the intestine. *Science (New York, NY)* 2001;291:881-4.
257. Petersson J, Schreiber O, Hansson GC, et al. Importance and regulation of the colonic mucus barrier in a mouse model of colitis. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology* 2011;300:G327-33.
258. Johansson ME, Larsson JM, Hansson GC. The two mucus layers of colon are organized by the MUC2 mucin, whereas the outer layer is a legislator of host-microbial interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2011;108 Suppl 1:4659-65.
259. Vaishnav S, Yamamoto M, Severson KM, et al. The antibacterial lectin RegIIIgamma promotes the spatial segregation of microbiota and host in the intestine. *Science (New York, NY)* 2011;334:255-8.
260. Pull SL, Doherty JM, Mills JC, Gordon JI, Stappenbeck TS. Activated macrophages are an adaptive element of the colonic epithelial progenitor niche necessary for regenerative responses to injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2005;102:99-104.
261. Stappenbeck TS, Hooper LV, Gordon JI. Developmental regulation of intestinal angiogenesis by indigenous microbes via Paneth cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2002;99:15451-5.
262. Hughes HK, Rose D, Ashwood P. The Gut Microbiota and Dysbiosis in Autism Spectrum Disorders. *Current neurology and neuroscience reports* 2018;18:81.
263. Vuong HE, Yano JM, Fung TC, Hsiao EY. The Microbiome and Host Behavior. *Annual review of neuroscience* 2017;40:21-49.

264. Johansson MA, Saghafian-Hedengren S, Haileselassie Y, et al. Early-life gut bacteria associate with IL-4-, IL-10- and IFN-gamma production at two years of age. *PloS one* 2012;7:e49315.
265. Bruce-Keller AJ, Salbaum JM, Luo M, et al. Obese-type gut microbiota induce neurobehavioral changes in the absence of obesity. *Biol Psychiatry* 2015;77:607-15.
266. Barrett E, Ross RP, O'Toole PW, Fitzgerald GF, Stanton C. gamma-Aminobutyric acid production by culturable bacteria from the human intestine. *Journal of applied microbiology* 2012;113:411-7.
267. Sudo N, Chida Y, Aiba Y, et al. Postnatal microbial colonization programs the hypothalamic-pituitary-adrenal system for stress response in mice. *The Journal of physiology* 2004;558:263-75.
268. O'Mahony SM, Marchesi JR, Scully P, et al. Early life stress alters behavior, immunity, and microbiota in rats: implications for irritable bowel syndrome and psychiatric illnesses. *Biol Psychiatry* 2009;65:263-7.
269. Bailey MT, Dowd SE, Galley JD, Hufnagle AR, Allen RG, Lyte M. Exposure to a social stressor alters the structure of the intestinal microbiota: implications for stressor-induced immunomodulation. *Brain, behavior, and immunity* 2011;25:397-407.
270. Zijlmans MA, Korpela K, Riksen-Walraven JM, de Vos WM, de Weerth C. Maternal prenatal stress is associated with the infant intestinal microbiota. *Psychoneuroendocrinology* 2015;53:233-45.
271. Santos J, Yang PC, Soderholm JD, Benjamin M, Perdue MH. Role of mast cells in chronic stress induced colonic epithelial barrier dysfunction in the rat. *Gut* 2001;48:630-6.
272. Vijayaraghavan S, Karami A, Aeinehband S, et al. Regulated Extracellular Choline Acetyltransferase Activity- The Plausible Missing Link of the Distant Action of Acetylcholine in the Cholinergic Anti-Inflammatory Pathway. *PloS one* 2013;8:e65936.
273. Clarke G, O'Mahony SM, Dinan TG, Cryan JF. Priming for health: gut microbiota acquired in early life regulates physiology, brain and behaviour. *Acta paediatrica (Oslo, Norway : 1992)* 2014;103:812-9.
274. Liang S, Wang T, Hu X, et al. Administration of *Lactobacillus helveticus* NS8 improves behavioral, cognitive, and biochemical aberrations caused by chronic restraint stress. *Neuroscience* 2015;310:561-77.
275. Matthews DM, Jenks SM. Ingestion of *Mycobacterium vaccae* decreases anxiety-related behavior and improves learning in mice. *Behavioural processes* 2013;96:27-35.
276. Emge JR, Huynh K, Miller EN, et al. Modulation of the microbiota-gut-brain axis by probiotics in a murine model of inflammatory bowel disease. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology* 2016;310:G989-98.
277. Gareau MG, Wine E, Rodrigues DM, et al. Bacterial infection causes stress-induced memory dysfunction in mice. *Gut* 2011;60:307-17.
278. Desbonnet L, Clarke G, Shanahan F, Dinan TG, Cryan JF. Microbiota is essential for social development in the mouse. *Molecular psychiatry* 2014;19:146-8.
279. Bravo JA, Forsythe P, Chew MV, et al. Ingestion of *Lactobacillus* strain regulates emotional behavior and central GABA receptor expression in a mouse via the vagus nerve. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2011;108:16050-5.
280. de Weerth C, Fuentes S, Puylaert P, de Vos WM. Intestinal microbiota of infants with colic: development and specific signatures. *Pediatrics* 2013;131:e550-8.
281. Tojo R, Suarez A, Clemente MG, et al. Intestinal microbiota in health and disease: role of bifidobacteria in gut homeostasis. *World J Gastroenterol* 2014;20:15163-76.
282. Gordon JI, Dewey KG, Mills DA, Medzhitov RM. The human gut microbiota and undernutrition. *Sci Transl Med* 2012;4:137ps12.
283. Taipale T, Pienihakkinen K, Isolauri E, et al. *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 in reducing the risk of infections in infancy. *The British journal of nutrition* 2011;105:409-16.
284. Haarman M, Knol J. Quantitative real-time PCR assays to identify and quantify fecal *Bifidobacterium* species in infants receiving a prebiotic infant formula. *Applied and environmental microbiology* 2005;71:2318-24.



285. de Meij TG, de Groot EF, Eck A, et al. Characterization of Microbiota in Children with Chronic Functional Constipation. *PloS one* 2016;11:e0164731.
286. Vatanen T, Kostic AD, d'Hennezel E, et al. Variation in Microbiome LPS Immunogenicity Contributes to Autoimmunity in Humans. *Cell* 2016;165:842-53.
287. Rumney CJ, Rowland IR. In vivo and in vitro models of the human colonic flora. *Crit Rev Food Sci Nutr* 1992;31:299-331.
288. Martoni C, Bhatena J, Urbanska AM, Prakash S. Microencapsulated bile salt hydrolase producing *Lactobacillus reuteri* for oral targeted delivery in the gastrointestinal tract. *Applied microbiology and biotechnology* 2008;81:225-33.
289. Li M, Wang B, Zhang M, et al. Symbiotic gut microbes modulate human metabolic phenotypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2008;105:2117-22.
290. Quigley EM. Bacterial flora in irritable bowel syndrome: role in pathophysiology, implications for management. *Journal of digestive diseases* 2007;8:2-7.
291. Kang S, Denman SE, Morrison M, et al. Dysbiosis of fecal microbiota in Crohn's disease patients as revealed by a custom phylogenetic microarray. *Inflamm Bowel Dis* 2010;16:2034-42.
292. Gong J, Yang C. Advances in the methods for studying gut microbiota and their relevance to the research of dietary fiber functions. *Food Research International* 2012;48:916-29.
293. Zuo T, Ng SC. The Gut Microbiota in the Pathogenesis and Therapeutics of Inflammatory Bowel Disease. *Front Microbiol* 2018;9:2247.
294. Kim N, Yun M, Oh YJ, Choi HJ. Mind-altering with the gut: Modulation of the gut-brain axis with probiotics. *J Microbiol* 2018;56:172-82.
295. Azad MB, Kozyrskyj AL. Perinatal programming of asthma: the role of gut microbiota. *Clinical & developmental immunology* 2012;2012:932072.
296. Ottman N, Smidt H, de Vos WM, Belzer C. The function of our microbiota: who is out there and what do they do? *Front Cell Infect Microbiol* 2012;2:104.
297. Azad MB, Konya T, Maughan H, et al. Gut microbiota of healthy Canadian infants: profiles by mode of delivery and infant diet at 4 months. *Cmaj* 2013;185:385-94.
298. Butel MJ, Waligora-Dupriet AJ, Wydau-Dematteis S. The developing gut microbiota and its consequences for health. *J Dev Orig Health Dis* 2018;9:590-7.
299. Nylund L, Satokari R, Salminen S, de Vos WM. Intestinal microbiota during early life - impact on health and disease. *The Proceedings of the Nutrition Society* 2014;73:457-69.
300. Funkhouser LJ, Bordenstein SR. Mom knows best: the universality of maternal microbial transmission. *PLoS biology* 2013;11:e1001631.
301. Shin A, Preidis GA, Shulman R, Kashyap PC. The Gut Microbiome in Adult and Pediatric Functional Gastrointestinal Disorders. *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association* 2019;17:256-74.
302. Denning NL, Prince JM. Neonatal intestinal dysbiosis in necrotizing enterocolitis. *Mol Med* 2018;24:4.
303. Sanchez M, Panahi S, Tremblay A. Childhood obesity: a role for gut microbiota? *International journal of environmental research and public health* 2014;12:162-75.